

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Šárka Špínová

Úloha antioxidantních enzymů v kardioprotektivních režimech chladové aklimace

Role of antioxidant enzymes in cardioprotective regimens of cold acclimation

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Daniela Horníková, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 21.4.2022

.....
Bc. Šárka Špínová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce doc. RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. za odborné vedení, všechny cenné rady, trpělivost a veškerý čas, který mi věnovala. Za všechnu pomoc, rady a podporu během práce v laboratoři bych také chtěla poděkovat své konzultantce RNDr. Daniele Horníkové, Ph.D. Dále chci poděkovat celé laboratorní skupině fyziologie svalů a signalizace chladové aklimace za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě patří můj velký dík za všechnu podporu během celého studia mým rodičům, celé mé rodině, přátelům a všem těm, kteří na mne dávají pozor.

Abstrakt

Účinek chladu na organismus závisí na míře chladu a době trvání. Chladová aklimace vyvolává termoregulační odpověď, třesovou termogenezi a následně rozvoj termogeneze netřesové spojené s aktivací hnědé tukové tkáně. Expozice mírnému chladu ve formě otužování má blahodárné účinky na celý organismus a nedávno bylo zjištěno, že má také kardioprotektivní účinky. Zvýšená antioxidační kapacita byla prokázána v mechanismu kardioprotekce vyvolané aklimací na hypoxii. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda je protektivní efekt mírné chladové aklimace (8 ± 1 °C) spojen se změnou kapacity antioxidačního systému. V rámci tohoto cíle byly stanoveny hladiny proteinů hlavních antioxidačních enzymů (superoxiddismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza, thioredoxin, thioredoxinreduktáza, akonitáza, hemoxygenáza) v průběhu aklimace na mírný chlad, konkrétně v 1-3-10 dnech, a následně po 5 týdnech a po 2-týdenním zotavení. Výsledky ukázaly změny v expresi většiny zkoumaných antioxidačních proteinů, jejichž vliv na kardioprotekci vyvolanou chladem musí být dále ověřen.

Klíčová slova: srdce, chladová aklimace, superoxiddismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza, thioredoxin, thioredoxinreduktáza, akonitáza, hemoxygenáza

Abstract

The effect of cold on the organism depends on the degree of cold and its duration. Cold acclimation induces a thermoregulatory response, shivering thermogenesis and subsequently the development of non-shivering thermogenesis associated with the activation of brown adipose tissue. Exposure to mild cold in the form of hardening possesses beneficial effects on the whole organism and recently the cardioprotective effects of mild cold acclimation has been described. Increased antioxidant capacity has been demonstrated in the mechanism of cardioprotection induced by hypoxia. The aim of this thesis was to find out whether the protective effect of mild cold acclimatization (8 ± 1 °C) is associated with a change in the capacity of the antioxidant system. To achieve this goal, the protein levels of the main antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, thioredoxin, thioredoxin reductase, aconitase, heme oxygenase) were determined during acclimation to mild cold, specifically in 1-3-10 days and subsequently after 5 weeks, and after a 2-week recovery. The results showed changes in most of the antioxidant proteins, however the effect on cold-elicited cardioprotection must be further verified.

Key words: heart, cold acclimation, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, thioredoxin, thioredoxin reductase, aconitase, heme oxygenase

Seznam použitých zkratek

ACO – akonitáza; akonitát hydratáza (*aconitase; aconitate hydratase*)

ACO1 – akonitáza 1; akonitát hydratáza 1; regulační protein železa 1 (*aconitase 1; aconitate hydratase 1; iron regulatory protein 1*)

ACO2 – akonitáza 2; akonitát hydratáza 2 (*aconitase 2; aconitate hydratase 2*)

Akt – proteinkináza B, také PKB (*protein kinase B*)

ALS – amyotrofická laterální skleróza (*amyotrophic lateral sclerosis*)

AMP – adenosinmonofosfát (*adenosine monophosphate*)

AP-1 – aktivátorový protein-1 (*activator protein 1*)

ApoE – apolipoprotein E (*apolipoprotein E*)

ASK1 – kináza regulující apoptotický signál (*apoptosis signal-regulating kinase 1*)

ATP – adenosintrifosfát (*adenosine triphosphate*)

BAT – hnědá tuková tkáň (*brown adipose tissue*)

Bax – *bcl-2-like protein 4*

Bid – *BH3 interacting-domain death agonist*

BMI – index tělesné hmotnosti (*body mass index*)

CAT – kataláza (*catalase*)

CCS – chaperon mědi pro SOD1 (*copper chaperone for superoxide dismutase*)

CIRBP – chladem indukovatelný protein vázající RNA (*cold-inducible RNA-binding protein*)

CO – oxid uhelnatý (*carbon monoxide*)

DTT – *dithiothreitol*

ERK – extracelulárním signálem regulovaná kináza, také MAPK (*extracellular signal-regulated kinase; mitogen-activated protein kinase*)

GTP – guanosintrifosfát (*guanosine triphosphate*)

GPX – glutathionperoxidáza (*glutathione peroxidase*)

H₂O₂ – peroxid vodíku (*hydrogen peroxide*)

HDL – vysokodenzitní lipoprotein (*high density lipoprotein*)

HIF – hypoxií indukovaný faktor (*hypoxia-inducible factor*)

HMOX – hemoxygenáza (*heme oxygenase*)

HMOX1 – hemoxygenáza 1; protein teplotního šoku 32 (*heme oxygenase 1; heat shock protein 32*)

HMOX2 – hemoxygenáza 2 (*heme oxygenase 2*)

IP – ischemický preconditioning (*ischemic preconditioning*)

I/R poškození – ischemicko-reperfuční poškození (*ischemia-reperfusion injury*)

JNK – c-Jun N-terminální kináza (*c-Jun N-terminal kinases*)

LDL – nízkodenzitní lipoprotein (*low density lipoprotein*)

MCU – mitochondriální vápníkový uniporter (*mitochondrial calcium uniporter*)

MEK – mitogenem aktivovaná proteinkináza kináza (*mitogen-activated protein kinase kinase*)

mitoK_{ATP} – mitochondriální ATP senzitivní draslíkový kanál (*mitochondrial ATP-sensitive potassium channel*)

mPTP – mitochondriální pór přechodné propustnosti (*mitochondrial permeability transition pore*)

mTOR – *mammalian target of rapamycin*

NAD – nikotinamidadenindinukleotid (*nicotinamide adenine dinucleotide*)

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NCX – Na⁺-Ca²⁺ výměník (*sodium-calcium exchanger*)

NF-κB – nukleární faktor kappa B (*nuclear factor kappa B*)

NHE – Na-H výměník (*sodium-proton exchanger*)

NO – oxid dusnatý (*nitric oxide*)

eNOS – endoteliální syntáza oxidu dusnatého (*endothelial nitric oxide synthase*)

iNOS – indukibilní syntáza oxidu dusnatého (*inducible nitric oxide synthase*)

NOX – NADPH oxidáza (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*)

NST – netřesová termogeneze (*non-shivering thermogenesis*)

O₂^{•-} – superoxid (*superoxide*)

•OH – hydroxylový radikál (*hydroxyl radical*)

PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza (*phosphatidylinositol 3-kinase*)

Rac1 – *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

Raf – *proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*

Ras – *proto-oncogene GTPase*

Ref-1 – redoxní faktor 1 (*redox factor-1*)

RISK – *reperfusion injury salvage kinase*

ROS – reaktivní forma kyslíku (*reactive oxygen species*)

p53 – tumor supresorový protein 53 (*tumor supressor protein 53*)

PKC – proteinkináza C (*protein kinase C*)

PRDX – peroxiredoxin (*peroxiredoxin*)

SARS-CoV-2 - *severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2*

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*

SOD – superoxiddismutáza (*superoxide dismutase*)

SOD1 – superoxiddismutáza 1, také Cu/Zn SOD (*superoxide dismutase 1*)

SOD2 – superoxiddismutáza 2, také Mn SOD (*superoxide dismutase 2*)

SOD3 – superoxiddismutáza 3, také EC-SOD (*extracellular superoxide dismutase 3*)

TNF – faktor nádorové nekrózy (*tumor necrosis factor*)

TRX1 – thioredoxin (*thioredoxin*)

TRX1 – thioredoxin 1 (*thioredoxin 1*)

TRX2 – thionredoxin 2 (*thioredoxin 2*)

TXNRD – thioredoxinreduktáza (*thioredoxin reductase*)

TXNRD1 – thioredoxinreduktáza 1 (*thioredoxin reductase 1*)

TXNRD2 – thioredoxinreduktáza 2 (*thioredoxin reductase 2*)

UCP – odpráhující protein (*uncoupling protein*)

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1. Ischemicko-reperfúzní poškození.....	2
2.1.1. Oxidativní stres v ischemii a reperfúzi.....	5
2.2. Kardioprotekce.....	5
2.2.1. Modely kardioprotekce.....	6
2.2.1.1. Ischemický preconditioning.....	6
2.2.1.2. Postconditioning.....	8
2.2.1.3. Hypoxie.....	8
2.2.1.4. Cvičení.....	9
2.2.1.5. Chladová aklimace.....	10
2.3. Antioxidační systém.....	12
2.3.1. Antioxidanty odpovědné za degradaci ROS.....	13
2.3.1.1. Superoxiddismutáza.....	13
2.3.1.2. Kataláza.....	17
2.3.1.3. Glutathionperoxidáza.....	18
2.3.2. Enzymy udržující v buňce redox homeostázu.....	19
2.3.2.1. Thioredoxin.....	19
2.3.2.2. Thioredoxinreduktáza.....	24
2.3.3. Antioxidanty spojené s metabolismem železa.....	25
2.3.3.1. Akonitáza.....	25
2.3.3.2. Hemoxigenáza.....	27
3. Cíle diplomové práce.....	30
4. Metodika.....	31
4.1. Zvířata.....	31
4.2. Akutní chladová aklimace.....	31
4.3. Chronická chladová aklimace.....	31
4.4. Odběr orgánů, zpracování vzorků a měření koncentrace proteinů.....	31
4.5. SDS elektroforéza.....	32
4.6. Western blot.....	33
4.7. Statistická analýza.....	33
5. Výsledky.....	34
5.1. Charakterizace hmotnostních parametrů potkanů v akutní a chronické chladové aklimaci a regresi.....	34
5.2. Charakterizace postnukleárního supernatantu.....	35

5.3. Antioxidanty odpovědné za degradaci ROS.....	35
5.3.1. Superoxiddismutáza 1	35
5.3.2. Superoxiddismutáza 2	36
5.3.3. Kataláza	36
5.3.4. Glutathionperoxidáza 4	37
5.4. Enzymy udržující v buňce redox homeostázu.....	37
5.4.1. Thioredoxin 1	37
5.4.2. Thioredoxin 2	38
5.4.3. Thioredoxin reduktáza 1	38
5.4.4. Thioredoxin reduktáza 2.....	39
5.5. Antioxidanty spojené s metabolismem železa.....	39
5.5.1. Akonitáza 2.....	39
5.5.2. Hemoxygenáza 1	40
6. Diskuze.....	41
7. Závěr.....	47
8. Seznam použité literatury	48
9. Přílohy	63
9.1. Příloha 1	63
9.2. Příloha 2	65

1. Úvod

Je známo, že v ischemicko-reperfúzním poškození srdce hraje významnou úlohu oxidativní stres v reperfúzi. Oxidativní stres v srdci je součástí procesů vyvolávajících srdeční hypertrofii, buněčnou apoptózu, podílí se na srdečním selhání po ischemicko-reperfúzním poškození. Nicméně mírný oxidativní stres je součástí mnoha signálních drah, z nichž některé hrají významnou úlohu v kardioprotekci. S tím spojené zvýšení endogenní antioxidační ochrany může předcházet následkům ischemicko-reperfúzního poškození nebo je eliminovat. Proto jsou stále v popředí zájmu molekuly s obecným názvem reaktivní formy kyslíku (ROS), které kvůli své vlastní nestabilitě snadno reagují s dalšími molekulami. Množství ROS v daném buněčném kompartmentu a v daném okamžiku je závislé na rychlosti jejich vzniku a kapacitě antioxidačního systému, který ROS eliminuje. Pokud ale tvorba ROS přesáhne možnosti antioxidačního systému, dochází k rozvoji oxidativního stresu, rozsáhlým peroxidačním reakcím, poškození buněčných struktur a v krajním případě k buněčné smrti.

V naší laboratoři byl objeven nový kardioprotektivní režim založený na mírné chladové aklimaci, který snižuje velikost infarktu, zvyšuje odolnost mitochondrií a vede k desenzitizaci adrenergní signalizace, avšak úloha oxidativního stresu v tomto modelu není dosud známa. Tato diplomová práce si klade za cíl zjistit, zda aklimace na mírný chlad zvyšuje kapacitu antioxidačních enzymů v průběhu tohoto procesu.

2. Literární přehled

2.1. Ischemicko-reperfúzní poškození

Srdce je vysoce oxidativní tkáň a pro svou správnou funkci vyžaduje dostatečné zásobení kyslíkem, který je zajišťován koronárním řečištěm. Metabolická aktivita srdce může vzrůst během několika sekund až čtyřikrát, což vede k okamžitému zvýšení požadavku na dodávku energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP). Za běžných podmínek se většina ATP tvoří mitochondriální respirací, tedy formou oxidativní fosforylace, která vyžaduje kyslík. Omezení přístupu kyslíku vede k hypoxii tkáně, a pokud průtok krve v koronárním řečišti klesne pod 50 %, tak hovoříme o ischemii, která je doprovázena sníženou dodávkou živin a sníženým odvodem zplodin buněčného metabolismu. Tento stav metabolické deprivace, může vyústit v poškození srdeční tkáně a funkce srdce se všemi následky (Ingwall 2009).

Ischemicko-reperfúzním (I/R) poškozením je nazýváno poškození tkáně způsobené déle trvající ischemií, ale poškození samotné se více rozvíjí až po znovuobnovení průtoku krve, tedy v reperfúzi. V ischemické tkáni dochází ke snížení tvorby ATP, akumulaci protonů, a tedy snížení pH, zvýšení anaerobní glykolýzy a tedy spotřeby glukózy a hromadění laktátu (Rehring et al. 1998). Čím je delší vystavení ischemii, tím větší je následné poškození způsobené především ztrátou adeninových nukleotidů, změnou pH a nárůstem intracelulární koncentrace vápenatých iontů. Funkce srdce po ischemii trvající do 20 minut se zdá být obnovitelná. Delší ischemie má však za následek trvalé poškození. Bylo zjištěno, že částečná deplece glykogenu předcházející ischemii může vést ke snížení tvorby laktátu a hromadění protonů, a po reperfúzi pak zlepšovat obnovení funkce levé komory (Neely a Grotyohann 1984; Tani a Neely 1989).

Jedním z hlavních problémů, který nastává během ischemie, je iontová dysbalance způsobená snížením intracelulárního pH a akumulací protonů. Na počátku kaskády I/R poškození tak stojí Na-H výměník (NHE), který za fyziologických podmínek přenáší antiportem protony ven z buňky a sodné ionty pouští dovnitř do buňky. Během ischemické fáze však musí být silně navýšena činnost tohoto výměníku, vzhledem k nadměrnému hromadění protonů v buňce. Protony, které s pomocí NHE přecházejí do extracelulárního prostoru, způsobují to, že je během ischemie pH nižší než obvykle nejen intracelulárně, ale i extracelulárně. Problémem, který s sebou posílená funkce NHE dále nese, je nadměrné zvyšování intracelulární koncentrace sodných iontů. Podání inhibitoru NHE, amiloridu, před samotnou ischemií výrazně snižuje intracelulární koncentraci sodných iontů. Neinhibovaný NHE však v ischemické buňce zapříčiňuje tvorbu vysokého koncentračního gradientu sodných iontů (Obr. 1A). Intracelulární koncentrace sodných iontů stoupá několikanásobně a obrací tak

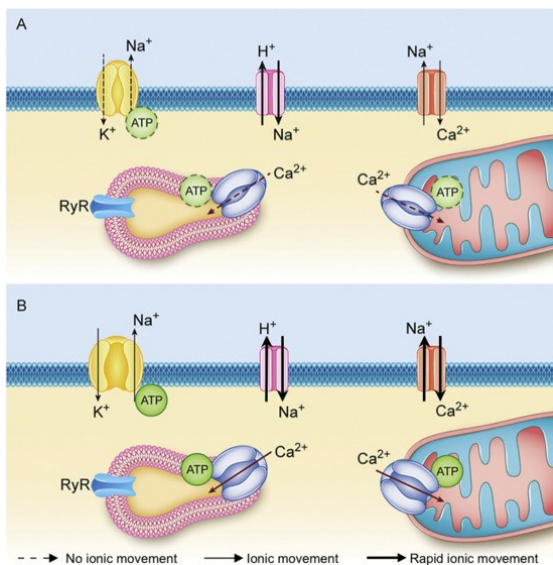
funkci dalšího výměníku, který se nazývá $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ výměník (NCX) (Tani a Neely 1989; Murphy et al. 1991; White et al. 2017).

Při reperfúzi dochází k odplavení protonů z extracelulárního prostoru, a tedy k obnovení extracelulárního pH. Jak se buňka stále zbavuje protonů, vrací se postupně i její vnitřní pH na obvyklou hladinu. Funkce NHE tedy během reperfúze neustává a posiluje tak ještě reverzní funkci NCX lokalizovaného na buněčné membráně (Obr. 1B). Dochází tak k výtoku tří sodných iontů z buňky výměnou za jeden vápenatý ion, který vstoupí do buňky (White et al. 2017). Delece NCX u myocytů vede ke snížení maximální kontraktility a enddiastolického tlaku během ischemie. Naopak během reperfúze prokazují srdce nižší postischemickou kontraktální dysfunkci. Dále pak je u myocytů s delecí NCX pozorováno signifikantní snížení velikosti infarktu (Imahashi et al. 2005). Za ischemických podmínek se tedy v srdečních buňkách hromadí díky NCX vápenaté ionty, to má za následek zvýšení diastolického tlaku a snížené obnovení komorové funkce (Tani a Neely 1989).

Nová, a dalo by se jistě říci i průlomová, myšlenka nabízí možné využití dárců pro transplantaci srdce z řad pacientů, kteří zemřeli následkem selhání oběhového systému, při použití speciálního složení perfúzního roztoku. Srdce takových dárců prošla globální ischemií a během jejich transplantace by při jejich reperfúzi hrozilo I/R poškození transplantovaného srdce. Z toho důvodu se navrhuje použití speciálního reperfúzního roztoku podaného ex-vivo, který by zamezil poškození po náhlé reperfúzi srdce. Takový roztok by byl hypokalcemický, aby snížil vtok vápenatých iontů pomocí NCX z extracelulárního prostředí, a měl by mírně kyselé pH (6,9), které by zamezovalo silnému výtoku protonů přes NHE při reperfúzi srdce a zabraňovalo tak rychlému navrácení buněk ke svému normálnímu pH, jak se tomu děje při I/R poškození (Obr. 1). Tím pádem by mohlo dojít k významnému rozšíření okruhu dárců (White et al. 2017).

Mluvíme zde o tzv. pH paradoxu (Lemasters et al. 1996). Ten nám říká, že po reperfúzi, která vede k návratu fyziologického pH tkáně, dochází k výrazné smrti daných tkáňových buněk. Reoxygenace s kyselejším pH naopak přispívá k jejich zachování a zmenšení tkáňového reperfúzního poškození. Ochrana tkáně před I/R poškozením souvisí s aktivací signální dráhy fosfatidylinositol-3-kináza - proteinkináza B - endoteliální syntáza oxidu dusnatého (PI3K-Akt-eNOS) (Qiao et al. 2013), o které budeme dále hovořit v kapitole 2. 2. Kardioprotekce.

Změna z kyselého pH během ischemie (pH 6,4) na fyziologické pH během reperfúze (pH 7,4) dramaticky zvyšuje vodivost tzv. mitochondriálního póru přechodné propustnosti (mPTP). Kyselým pH je totiž jeho otevírání blokováno a dochází k němu tak většinou až během reperfúze (Griffiths a Halestrapt 1995; Murata et al. 2001; Seidlmayer et al. 2015). Významný vliv na jeho otevření má také vysoká mitochondriální koncentrace vápenatých iontů, která je součástí vápníkového přetížení a během ischemie roste. Do mitochondrie se ionty dostávají pomocí mitochondriálního vápníkového uniporteru (MCU) a patrně i dalšími mechanismy. Prodloužené otevření mPTP má za následek kolaps mitochondriálního membránového potenciálu. Během ischemie dochází k jeho prohloubené depolarizaci, s nástupem reperfúze k rychlé repolarizaci. Ke konci reperfúze je však membránový potenciál znovu depolarizovaný, a to silně pod úroveň původního klidového potenciálu a dokonce i pod úroveň depolarizace během předcházející ischemie (Seidlmayer et al. 2015; Briston et al. 2017). Otevírání mPTP má dále za následek úbytek nikotinamidadenin dinukleotidu (NAD^+), mitochondriální swelling (Di Lisa et al. 2001), a následné uvolňování proapoptotických proteinů, jako je cytochrom c, do cytoplasmy (Ichimura et al. 2011).



Obr. 1: Průběh sodno-vápenatého přetížení. **A)** Během ischemie dochází díky nízkému intracelulárnímu pH ke zvýšenému výtoku protonů z buňky a vstoku sodných iontů do buňky pomocí $\text{Na}^+\text{-H}^+$ výměníku (NHE). Sodné ionty tak nemohou být navráceny zpět do extracelulárního prostoru s pomocí sodno-draselné pumpy, která snižuje svoji aktivitu vzhledem ke sníženému ATP/ADP poměru. Sodné ionty jsou transportovány pomocí $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ výměníku (NCX) ven z buňky a vápenaté ionty se pak hromadí v cytosolu buňky. **B)** Během reperfúze, dochází k odplavení extracelulárních protonů, a tedy zvýšení extracelulárního pH. Funkce NHE je tímto znovu posílena, prohlubuje se sodné přetížení, a NHE transportuje z buňky protony a do buňky sodné ionty. Sodné ionty jsou odstraňovány se silným přispěním reverzního NCX. Jelikož během reperfúze již dochází ke zvýšené tvorbě ATP formou aerobní oxidativní fosforylace, obnovuje se funkce sodno-draselné pumpy, která tak může postupně navrátit klidový membránový potenciál buňky (převzato z White et al. 2017).

Přechodné krátké otevření mPTP během ischemické prekondice a nízká tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) mohou ale napomáhat udržování vápníkové homeostázy a vykazovat tak naopak kardioprotektivní účinky (Hausenloy et al. 2004b). O tomto efektu budeme dále hovořit v kapitole 2.2. Kardioprotekce.

2.1.1. Oxidativní stres v ischemii a reperfúzi

V ischemii se ve tkáni přítomné ATP rozkládá až na adenosinmonofosfát (AMP), který slouží jako signální molekula. Pokud nedostatek kyslíku trvá, tak je AMP dále přeměňováno postupně přes adenosin a inosin na hypoxantin (BERNE 1963; Schrader a Gerlach 1976). Obnovení přístupu kyslíku, tedy reoxygenace nebo reperfúze, s sebou však přináší problémy v podobě na kyslíku závislé xantin oxidázy. Ta se ve tkáních za normoxických podmínek nachází v mnohem menším množství než na NAD^+ závislá xantin dehydrogenáza. V potkaním srdci byl naměřen poměr xantin oxidáza / xantin dehydrogenáza jako 20/80. Ischemie a následná reperfúze měly za následek přeměnu menší části přítomné xantin dehydrogenázy na xantin oxidázu s pomocí xantin konvertujícího enzymu (Bindoli et al. 1988). Xantin oxidáza může díky přítomnému kyslíku v reperfúzi opět katalyzovat přeměnu hypoxantinu, který vznikl během ischemie, na xantin, a xantinu na kyselinu močovou za současné produkce ROS. 70-95 % takto vzniklých ROS činí peroxid vodíku (H_2O_2), menší podíl pak tvoří superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$). (Kelley et al. 2010). Za I/R poškození se totiž většina vzniklého $\text{O}_2^{\cdot-}$ tvoří již během ischemie, naopak většina H_2O_2 během reperfúze. Tvorba $\text{O}_2^{\cdot-}$ během ischemie je stimulována vstupem vápenatých iontů přes MCU do mitochondrie (Seidlmayer et al. 2015).

Oxypurinol, blokátor xantin oxidázy, velmi významně snižuje tvorbu ROS v reperfúzaném srdci (Thompson-Gorman a Zweier 1990). Podání superoxid-dismutázy (SOD), tedy enzymu, který katalyzuje přeměnu $\text{O}_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 , mělo pak za následek snížení střevní kapilární permeability způsobené lokální ischemií (Granger et al. 1981) nebo intraarteriální infuzí xantin oxidázy (Parks et al. 1984). Kataláza (CAT), enzym, který katalyzuje přeměnu H_2O_2 na vodu a kyslík, zase významně snižovala spotřebu kyslíku boviních arteriálních endoteliálních buněk způsobenou přidáním xantinu. Samotná SOD na spotřebu kyslíku takový efekt neměla, pokud se ale přidala společně s CAT, byla pozorována ještě nižší, xantinem vyvolaná, spotřeba kyslíku než po přidání CAT samotné (Kelley et al. 2010).

2.2. Kardioprotekce

Celosvětově zemřelo v roce 2019 na komplikace spojené s kardiovaskulárními potížemi 17,9 milionů lidí. Kardiovaskulární choroby se tím pádem drží na nechvalném prvním místě žebříčku smrtících chorob. V 85 % z těchto případů je pak úmrtí způsobeno srdečním infarktem nebo mozkovou mrtvicí, tedy v důsledku nedostatečného přístupu kyslíku k dané tkáni (WHO, 2021).

Z tohoto důvodu je důležitý vývoj léků, zkoumání ischemických a reperfúzních procesů a rozvíjení účinných kardioprotektivních modelů. O několika takových modelech se zmíníme v následující kapitole.

2.2.1. Modely kardioprotekce

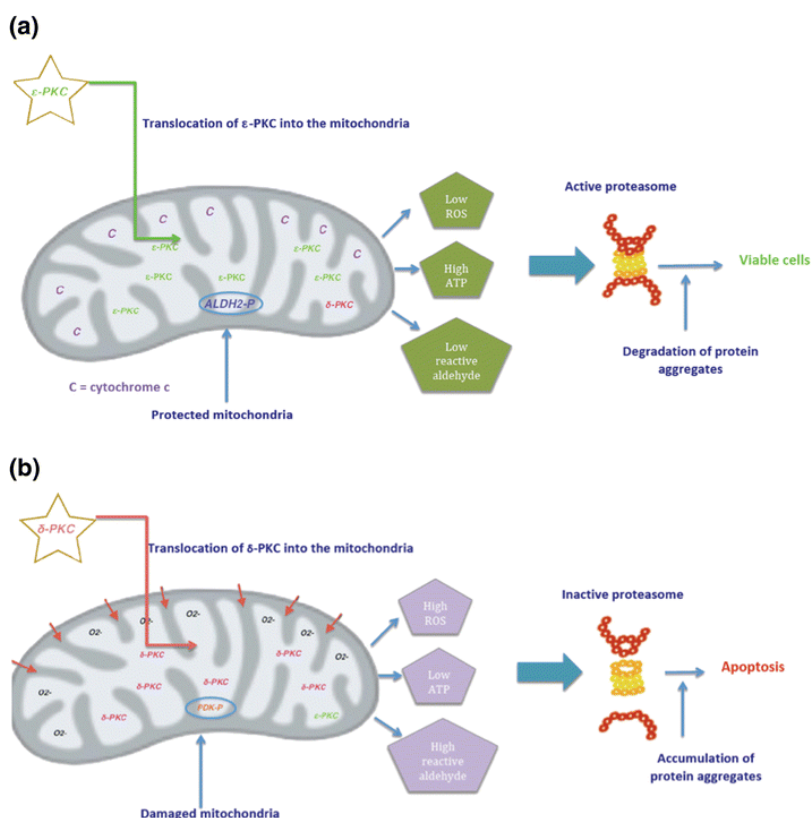
2.2.1.1 Ischemický preconditioning

V roce 1986 popsal Murry ve svých dvou pracích novou techniku ochrany srdce proti I/R poškození, zvanou ischemický preconditioning (IP). Jednalo se o sérii krátkých period ischemie, které měly kupodivu protektivní efekt. Naproti tomu nepřerušovaná 40 minut trvající okluze koronární arterie u psa způsobila 87% depleci ATP a 67% depleci adeninového nukleotidového poolu. Krátká 10 minut dlouhá okluze však způsobila jen 61% depleci ATP a 41% depleci adeninového nukleotidového poolu. Pokud se navodily dokonce čtyři takové 10-minutové okluze (s 20-minutovou reperfúzí po každé okluzi), nebyla pozorována významnější celková deplece než po první krátké okluzi. Během 20-minutové reperfúze totiž došlo k částečnému obnovení ATP i adeninového nukleotidového poolu, a každá následující okluze způsobila nižší úbytek ATP a adeninového nukleotidového poolu než první. Tento IP sestávající ze čtyř 10-minutových ischemií také významně snížil velikost infarktu a tkáňovou nekrózu (Reimer et al. 1986). Čtyři krátké 5 minut dlouhé okluze koronární arterie (s 5-minutovou reperfúzí po každé okluzi) vykazovaly též silný kardioprotektivní účinek. Důležitým zjištěním je také to, že pokud byla po poslední krátké reperfúzi vyvolána nepřerušovaná 40 minut dlouhá okluze (následovaná reperfúzí), velikost infarktu byla oproti skupině, která ischemickou prekondicí neprošla, o 75 % nižší. Pokud však místo 40 minut trvala nepřerušovaná okluze 180 minut, prekondice již nevykazovala požadovaný efekt (Murry et al. 1986).

IP způsobuje již zmíněné nízko-vodivostní otevření mPTP, to vede k úniku nahromaděných vápenatých iontů z mitochondrie do cytosolu. Ochranná funkce prekondice může být zrušena inhibicí právě tohoto póru a také vychytáváním ROS. Otevření mPTP je tedy stejně tak jako tvorba ROS pro IP nezbytné (Hausenloy et al. 2004b). IP zároveň chrání srdce přes fosforylaci kináz cytoprotektivní dráhy RISK (z anglického *reperfusion injury salvage kinase*). Jedná se o signální dráhy PI3K-Akt-mTOR a Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2. V první zmíněné dráze zprostředkovává fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K) fosforylaci proteinkinázy B (PKB nebo také Akt), ta zase následně fosforyluje savčí serin/threoninovou kinázu mTOR. Ve druhé zmíněné dráze aktivovaná Ras GTPáza aktivuje Raf kinázu, která

fosforyluje mitogenem aktivovanou proteinkinázu kinázu (MEK1/2), ta zase fosforyluje extracelulárním signálem regulovanou kinázu (ERK1/2 nebo také MAPK). Obě tyto dráhy se vzájemně funkčně ovlivňují, inhibice jedné dráhy totiž posiluje dráhu druhou (Hausenloy et al. 2004a). IP vykazuje bifázickou fosforylaci Akt i ERK1/2. To znamená, že k jejich první fosforylaci dojde již během prekondice, ke druhé pak během reperfúze (Hausenloy et al. 2005).

IP může být navozován také stimulací mitochondriálního ATP senzitivního draslíkového kanálu (mitoK_{ATP}), a to jak akutní, tak pozdní prekondice. Pozdní prekondice bylo dosaženo pomocí diazoxidu podaného 24 hodin před ischemií a reperfúzí. Diazoxid specificky otevírá mitoK_{ATP} kanál. Protektivní efekt se zdá závislý na signalizační dráze proteinkinázy C (PKC) (Takashi et al. 1999). Odlišné izoenzymy PKC mají odlišnou funkci (Obr. 2) (Singh et al. 2017). MitoK_{ATP} kanál zmírňuje hromadění vápníku v mitochondriální matrix a depolarizuje mitochondriální membránový potenciál (Murata et al. 2001).



Obr. 2: Role izoenzymů proteinkinázy C (PKC) v ischemické srdeční chorobě. **a)** Během ischemického preconditioningu předcházejícího prodlouženou ischemií a reperfúzi dochází k aktivaci PKC- ϵ , která se translokuje do mitochondrie, a tím zabráňuje jejímu poškození, zvyšuje množství ATP v buňce a dále pak aktivitu proteazomu, naopak snižuje množství ROS a reaktivního aldehydu přes aktivaci aldehyd dehydrogenázy 2 (ALDH2). **b)** Prodloužená ischemie a reperfúze aktivuje ve větším množství translokaci izoenzymu PKC- δ do mitochondrie, to vede k mitochondriální dysfunkci, zvýšenému množství ROS a zvýšené tvorbě reaktivních aldehydů, sníženému množství ATP a aktivitě proteazomu a následně tedy k apoptóze a nekróze (převzato z Singh et al. 2017).

Preconditioning může být paradoxně vyvolán i podáním perfuzátu s vysokou koncentrací vápenatých iontů. Takováto krátká 5-minutová perfúze je vystřídána 10-minutovou perfúzí běžným perfuzátem. Teprve potom může být navozena ischemie následovaná reperfúzí. Taková prekondice měla za následek zachování buněčné struktury, snížení množství laktát

dehydrogenázy a vzestup ATP. Vápenaté ionty zde totiž fungují jako spouštěč PKC (Miyawaki a Ashraf 1997).

2.2.1.2. Postconditioning

Postconditioning je kardioprotektivní model postavený na krátkých cyklech reperfúze a reokluze, které se provádějí až během časně reperfúze. Prodlužují tak buněčnou acidózu a zabraňují tím pádem rozvoji dříve zmíněného pH paradoxu. Acidóza inhibuje produkci ROS a spouští signalizaci přes RISK dráhu: PI3k-Akt-eNOS. Dochází tak k aktivaci eNOS a tím pádem k uvolňování vazodilatátoru oxidu dusnatého (NO) (Qiao et al. 2013). Ischemický postconditioning dokázal z dlouhodobého hlediska výrazně zlepšit kontraktilní funkci levé komory u pacientů, kteří utrpěli infarkt myokardu (Zhao et al. 2012), stejně tak snížit velikost infarktu u pacientů s rozsáhlou oblastí zasaženou ischemií (Sörensson et al. 2010).

Podobné výsledky jako mechanický postconditioning může mít i postconditioning farmakologický. Požadovaného snížení pH by tak mohlo být dosaženo i podáním kyselé látky, například kyseliny mléčné (Qiao et al. 2013; Zhang et al. 2015).

2.2.1.3. Hypoxie

Jako další kardioprotektivní model si můžeme zmínit adaptaci na hypoxii, tedy adaptaci na nedostatek kyslíku. Tento model je již více než 40 let studován v kontextu zvýšené odolnosti levého srdce k ischemii současně s jejím adverzivním vlivem na pravou komoru vyvolaným plicní hypertenzí.

Chronická intermitentní hypobarická hypoxie úspěšně snižovala velikost infarktu a zlepšovala kontraktilní funkce. Podstatou bylo snížení buněčného přetížení vápenatými ionty a zvýšení viability kardiomyocytů (Kolář a Ošťádal 2004). Protektivního efektu bylo také dosaženo díky podpoře metabolismu glukózy, tedy up regulaci glukózového transportéru typu 4, fosforylované AMP-aktivované protein kinázy, „*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*“, a down regulaci srdeční pyruvátdehydrogenázy lipoamid kinázy izoenzymu 4 (Li et al. 2016; Gu et al. 2018).

Chronická kontinuální normobarická hypoxie taktéž viditelně snižovala velikost infarktu. Důležitou roli i zde hraje PKC a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, jak bylo také ukázáno, tak sarkolemální K_{ATP} neměl žádný vliv. Před ischemií i během reperfúze bylo dále naměřeno zvýšení obsahu dusitanů a dusičnanů v séru a v srdeční tkáni (Tsibulnikov et al. 2018). Během ischemie se signifikantně zvyšovala hladina fosforylované PKB/Akt. Po ischemii bylo zase naměřeno zvýšení hladiny hexokinázy 1 a 2 a celkové hexokinázové aktivity. Během reperfúze byla pozorována vyšší kolokalizace hexokinázy 2 s mitochondrií nebo také potlačení down regulace

mitochondriální kreatinkinázy (Kolar et al. 2017). Podpora funkce mitochondriální kreatinkinázy a izoforem hexokinázy zvyšuje recyklaci ADP a tím stimuluje dýchací řetězec. Může tak redukovat tvorbu ROS a vznik oxidativního stresu (Santiago et al. 2008; Waskova-Arnostova et al. 2014). Zvýšená aktivita hexokináz a asociace hexokinázy 2 s mitochondrií byla pozorována i při aplikaci intermitentní hypobarické hypoxie 7000 m (Waskova-Arnostova et al. 2015).

Intermitentní aklimace v režimu normobarické hypoxie (23 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) zrušila hypoxický kardioprotektivní efekt. Další dva hypoxické režimy kardioprotektivní efekt navodily, a to spolu se změnou transkripční aktivity mnoha antioxidantů. Prvním z těchto dvou režimů byla chronická kontinuální normobarická hypoxie (24 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂). Zaznamenána byla zvýšená hladina mRNA transkriptu SOD1 i SOD2, peroxiredoxinů (PRDX), a to PRDX2 a PRDX5, glutathionperoxidázy 4 (GPX4), glutathionreduktázy, hemoxygenázy 1 (HMOX1), mitochondriálního thioredoxinu 2 (TRX2) a thioredoxinreduktázy 2 (TXNRD2). Hladina mRNA transkriptu CAT byla naopak snížena. Druhým kardioprotektivním režimem byla intermitentní normobarická hypoxie (8 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂). Navýšen byl mRNA transkript SOD2, PRDX2 a PRDX6, glutathionreduktázy, akonitázy 1 (ACO1), TRX2 a TXNRD2. mRNA transkript CAT byl snížen podobně jako u předchozího režimu. U akonitázy 2 (ACO2) byl zvýšen ve všech třech hypoxických režimech (Kasparova et al. 2015).

2.2.1.4. Cvičení

Prokazatelně prospěšnou kardioprotektivní metodou je také fyzická aktivita a cvičení. Vytrvalostní cvičení zvyšuje hladinu antioxidantních enzymů, jakými jsou SOD, CAT a GPX, a to jak u subsarkolemálních, tak u intermyofibrilárních mitochondrií, o kterých se ještě zmíníme. Dále pak snižuje s pomocí ROS způsobený výlev cytochromu c z intermyofibrilárních mitochondrií, rychlost otevírání mPTP póru (Kavazis et al. 2008) a ochraňuje mitochondrie vystavené I/R před narušením jejich oxidativní fosforylace (Lee et al. 2012). Vytrvalostní cvičení může dále snížit I/R vyvolanou apoptózu myocytů potkanů, a to bez závislosti na jejich věku, zlepšit antioxidantní kapacitu srdce a zabraňovat aktivaci proteázy kalpainu (Quindry et al. 2005). Fyzický trénink může snižovat i výskyt srdečních arytmií (Hamilton et al. 2004) a velikost infarktu (Carter a Amundsen 1977). Kombinované cvičení a adaptace na hypoxii vede ke kardioprotekci. V následujícím experimentu snížení velikosti infarktu při cvičení odpovídalo zhruba snížení po vystavení chronické hypoxii (24 h/den, 3 týdny, 0,12 FiO₂). Kombinace obojího však oproti očekávání žádný navýšený efekt nevykazovala. Cvičení však

v myokardu snížilo hladinu faktoru nádorové nekrózy α (TNF- α) zvýšeného chronickou hypoxií, i jeho receptoru a interleukinu 6. Zároveň také ale snižovalo touto hypoxií zvýšenou hladinu CAT a mitochondriální SOD2 (Alánová et al. 2017).

2.2.1.5. Chladová aklimace

Nejprve bychom se měli krátce zmínit o termoregulaci, tedy o zásadním procesu, který v těle probíhá a zabezpečuje zde správnou teplotu tělního jádra. Tělo reaguje jiným způsobem na teplé a jiným na chladné prostředí, a to ať už přímo vnitřními termoregulačními procesy nebo behaviorálně. Důležitý termoregulační proces, který je spouštěn v chladném prostředí se nazývá termogeneze, tedy tvorba tepla. Můžeme si ji rozdělit na: termogenezi způsobovanou svalovými stahy a na netřesovou termogenezi (NST). Za povšimnutí jistě stojí, že jedinci s vyšším zastoupením svalových vláken typu I se vyznačují nižší intenzitou svalového třesu než ti s převahou svalových vláken typu IIa (Blondin et al. 2017). NST se v posledních letech dostala do popředí zájmu, stejně jako hnědá tuková tkáň (BAT), která je hlavním místem NST u malých savců a novorozenců. Většina zásob energie v BAT není totiž přeměňována na ATP, jako je tomu během oxidativní fosforylace v mitochondriích u ostatních buněk, ale díky odpráhujícím proteinům (UCP) je vznikající protonový gradient spotřebován na teplo (Hiroshima et al. 2018).

K NST nedochází jen v BAT, ale také ve tkáni svalové. Protein, který reguluje pumpu SERCA a je nezbytný pro netřesovou svalovou termogenezi se nazývá sarkolipin. Delece genu pro sarkolipin u myši zvyšuje expresi UCP1 v BAT, tím pádem v ní zvyšuje termogenezi a mění se i samotná struktura BAT. To vše se děje už během velmi mírné chladové aklimace, tedy 16 °C. Naopak delece genu pro UCP1 zvyšuje ve svalech aktivitu sukcinát dehydrogenázy a expresi sarkolipinu. NST ve svalech a v BAT se tak jeví být propojená a doplňující jedna druhou (Bal et al. 2017). Zdá se dokonce pravděpodobné, že svalová NST nahrazuje tu v BAT u větších savců, kteří BAT postrádají (Nowack et al. 2019). Za povšimnutí stojí také to, že myši s delecí genu pro sarkolipin měly problémy s udržením stálé teploty tělního jádra (Bal et al. 2017).

Chladová aklimace se ukazuje být pro organismus velmi prospěšnou. Množství BAT koreluje inverzně s indexem tělesné hmotnosti (BMI), a to hlavně u starších lidí (Cypess et al. 2009). Proto je chladová aklimace hojně studována v kontextu léčení či předcházení obezity a metabolickému syndromu. Jak se ale ukazuje, obézní jedinci mají obvykle méně aktivní právě BAT (Orava et al. 2013). Jednou z důležitých často pokládaných otázek je tedy ta, zda může aklimace na chlad vylepšit funkci BAT a NST u těchto lidí. Krysy aklimované nepřerušovaně

po dobu 4 týdnů při teplotě 4 °C prokázaly dvojnásobné zvýšení hmotnosti BAT, 40% nárůst hmotnosti nadledvin a v průměru 18% nárůst hmotnosti levé srdeční komory, hmotnost pravé srdeční komory se signifikantně nezměnila. Dále pak byla zaznamenána vysoká hladina hormonu trijodthyroninu v séru, zvýšený systolický tlak a menší velikost infarktu. Subjekty adaptované 8 h/den po dobu 4 týdnů při teplotě 4 °C zvýšily také hmotnost BAT, a to o 50 %, nevykazovaly však žádnou z dalších právě zmíněných změn, zato ale viditelné zvýšení hladiny hormonu tyroxinu (Tsibulnikov et al. 2019). Při aklimaci dochází v BAT ke zvýšené glykolýze a β -oxidaci mastných kyselin a tím pádem k podpoře metabolismu a aktivaci termogeneze. Tím dochází k usnadnění tvorby tepla s přispěním UCP1, jehož mRNA je po chladové aklimaci také signifikantně zvýšena (Hiroshima et al. 2018).

Chladová aklimace u člověka snížila chladem indukovaný svalový třes a zabránila škodlivému unikání (*leak*) protonů ve svalu, ke kterému by docházelo po náhlém vystavení chladu. Dále byl pozorován zvýšený objem metabolicky aktivní BAT a kapacity BAT (Blondin et al. 2017; Gordon et al. 2019). Zdá se tedy, že chladová aklimace u člověka zvyšuje NST a viditelně posiluje metabolickou aktivitu již existující BAT. Hnědnutí bílé tukové tkáně u lidí nebylo ale pozorováno (Van Der Lans et al. 2013).

Lokální chladové aklimace bylo dosaženo například opakovaným ponořováním nohou po kolena do studené vody (12 °C, 30 minut, 5 dní v týdnu, po 4 týdny). Taková aklimace zamezila náhlému zvýšení srdečního rytmu a systolického tlaku, ke kterému docházelo u kontrolních jedinců po jednorázovém ponoření nohou do 12 °C vody. Zároveň byla díky aklimaci zpozorována méně výrazná reakce okamžitého snížení teploty kůže, a tedy i zmírněná vazokonstrikce. To vše nasvědčovalo útlumu tónu sympatiku. Takto aklimatizovaní jedinci však po ponoření do studené vody až po hlavu nevykazovali změny v produkci tepla ani změny v prahové teplotě pro termogenezi (Janský et al. 2006).

Velice zásadní výzkumy benefitů chladové aklimace byly prováděny na otužilcích. Ti mají nižší prahovou teplotu pro spuštění termogeneze, což je dáno přizpůsobením kontrolních termoregulačních center (Vybíral et al. 2000), a mají také vysokou kapacitu pro NST (Janský et al. 2008). Kontrolní netrénovaní jedinci měli po ponoření do 14 °C vody sníženou rektální teplotu, zvýšenou rychlost srdečního rytmu a hodnoty krevního tlaku, především ale zesílený metabolický obrat a vysoce zvýšenou plasmatickou koncentraci noradrenalinu a dopaminu (Šrámek et al. 2000). Beta adrenergní receptory se podílejí na zhruba 80 % celkové termogeneze během okamžité odpovědi na náhlé ochlazování. Po přibližně 30 minutách ochlazování ale pokrývají už jen přibližně 20 % termogeneze (Šimečková et al. 2000). Kontrolní netrénovaní jedinci se zároveň začali třást okamžitě po ponoření do 13 °C

vody a celý proces během prvních 10 minut doprovázel viditelný vzestup metabolického obratu. Otužilci se naproti tomu začínali třást až přibližně po 40 minutách od začátku chladové expozice, jejich metabolický obrat vzrůstal taktéž pomaleji a pozorována byla také bradykardie a snížený objem krevní plazmy. To nasvědčovalo zastoupení NST v jejich termogenní odpovědi (Vybíral et al. 2000).

Jak bylo ukázáno v naší laboratoři, postupná mírná chladová aklimace (8 °C, 8 h/den, 1 týden, následována 8 °C, 24 h/den, 4 týdny) potkaních samců vedla ke zvýšení rezistence myokardu k I/R poškození, a tedy k viditelným kardioprotektivním účinkům, a to i po zotavování, tedy po dvoutýdenní regresi ve 24 °C. Proces nebyl provázený ani hypertenzí ani hypertrofií. Kardioprotekce zvyšovala mitochondriální odolnost k přetížení vápenatými ionty a zároveň neovlivňovala signalizaci adenyllyl cyklázy zprostředkovanou β -adrenergními receptory (Tibenska et al. 2020). Po návratu do kontrolních podmínek (regrese) (24 °C, 2 týdny), který následoval po 5 týdnech v 8 °C, byly prokázány přetrvávající kardioprotektivní účinky. Pomocí specifického inhibitoru β 2-adrenergních receptorů byla prokázána závislost kardioprotektivního mechanismu na této signální dráze. Současně s tím byla zvýšena exprese inhibičních G-proteinů a zvýšena aktivace PKB/Akt na úrovni fosforylace. Glykogen syntáza kináza-3 β , inhibitor apoptózy, se během chladové aklimace translokoval ze Z-disků do H-zóny, při fázi zotavování se vrátil na své původní místo (Tibenska et al. 2021). Na modelu třídní a desetidenní aklimace (8 \pm 1 °C, 24 h/den) byla v naší laboratoři dále zaznamenána odolnost srdce k ischemii (Marvanová, nepublikováno). Z toho důvodu jsme se rozhodli zjistit, zda je tento protektivní efekt mírného chladu spojen se změnou kapacity antioxidantního systému. O antioxidantním systému a antioxidantech bude pojednávat následující kapitola.

2.3. Antioxidační systém

K tvorbě ROS dochází běžně a v malé míře dokonce neustále, proto je také tak důležitá správná funkce buněčného antioxidantního systému.

ROS dělíme dle původu na radikálové a neradikálové. Radikálové ROS, jinak také zvané volné kyslíkové radikály, mají v jednom nebo více svých orbitalech nepárový elektron a ochotně tak reagují s dalšími molekulami. Příkladem takových radikálů jsou například $O_2^{\cdot-}$, hydroxylový radikál ($\cdot OH$) nebo peroxy. Mezi neradikálové ROS se řadí H_2O_2 , ozon nebo například kyselina chlorná. ROS se mohou rozpadat, reagovat s jinými molekulami nebo dokonce jeden s druhým a vytvářet tak další reaktivní molekuly. Nejzávažnější je aktivace Fentonovy reakce, která je nebezpečná hlavně kvůli vzniku vysoce reaktivního $\cdot OH$. ROS

vznikají v buňce též enzymatickou aktivitou, známými prooxidaty jsou např. peroxisomální oxidázy, NADPH oxidáza, monoaminoxidáza a xantinoxidáza. Dalším místem tvorby ROS jsou komplexy dýchacího řetězce v mitochondrii, tam vznikají hlavně díky úniku elektronů z komplexu I a z komplexu III (Snezhkina et al. 2019).

V malém množství je tvorba ROS neškodná a může být naopak dokonce prospěšná. Malé koncentrace ROS mohou působit například jako druzí poslové (Linley et al. 2012) nebo napomáhat buněčné regeneraci (Kato et al. 2016). Mírná tvorba ROS tedy není na škodu a se škodlivým množstvím si obvykle poradí antioxidační systém, ten se neustále snaží nastolit v těle potřebnou rovnováhu. Pokud ale tvorba ROS přesáhne možnosti antioxidačního systému, dochází k posunu pomyslných vah a k rozvoji oxidativního stresu. Oxidativní stres pak působí neblaze na celou buňku, poškozují jadernou i mitochondriální DNA stejně tak i proteiny a peroxiduje membránové lipidy, dochází tak k poškození mitochondrií, ke stárnutí a k smrti buňky, a potažmo k poškození celé tkáně. Oxidativní stres je též velmi nebezpečným faktorem pro kardiovaskulární systém. Srdeční tkáň spolu s celým kardiovaskulárním systémem je na zasažení oxidativním stresem velmi citlivá. Tvorba ROS přispívá ke vzniku srdečních arytmií, snížení funkce levé srdeční komory, srdeční hypertrofii, I/R poškození, srdečnímu selhání, apoptóze a nekróze. A právě proto, je tak důležitá jeho ochrana před oxidativním stresem (D’Oria et al. 2020).

Antioxidanty, které zásadně přispívají k ochraně buněk před oxidativním stresem, rozlišujeme na neenzymatické, například vitamin C, vitamin E nebo karotenoidy, a enzymatické. Ty enzymatické, o kterých bude tato kapitola dále pojednávat, si zde můžeme rozdělit do tří kategorií: antioxidanty odpovědné za degradaci ROS, enzymy udržující v buňce redox homeostázu, a antioxidanty spojené s metabolismem železa. V této kapitole se pokusím shrnout základní poznatky o některých z mnoha antioxidantů, budu soustředit svou pozornost na důsledek jejich nedostatku nebo nadbytku, a pokusím se také nalézt informace k jejich úloze v ochraně nebo správné funkci myokardu.

2.3.1. Antioxidanty odpovědné za degradaci ROS

Následující antioxidanty jsou odpovědné za přímou degradaci ROS, tím zabraňují jejich reakcím s dalšími molekulami nebo také jejich vzájemným reakcím a ve výsledku pak zejména vzniku vysoce nebezpečného $\cdot\text{OH}$.

2.3.1.1. Superoxiddismutáza

Prvním enzymem, kterým se budeme zabývat, je SOD. V kardiomyocytech jsou exprimovány tři její izoformy. SOD1 nebo také Cu/Zn SOD je intracelulární homodimerní

metaloenzym závislý na iontech mědi a zinku. Je lokalizována převážně v cytosolu, ale nachází se například i v mitochondriích a její ztráta tak může zásadně poškodit buněčné mitochondrie, narušit mitochondriální transmembránový potenciál a snížit tak produkci ATP (Aquilano et al. 2006). SOD2 nebo také MnSOD je intracelulárním homotetramerním enzymem s iontem manganu v aktivním místě. Je považována především za mitochondriální izoformu, nachází se však například i v peroxisomech. Třetí izoformou je SOD3 nebo také EC-SOD, která je lokalizována v extracelulárním prostoru a je závislá, stejně jako SOD1, na iontech mědi a zinku. Dále se však budeme zmiňovat jen o prvních dvou izoformách. Mechanismus jejich aktivity je dlouhodobě znám. Všechny izofomy katalyzují stejnou reakci, dismutaci $O_2^{\bullet-}$ na kyslík a H_2O_2 , která je vyjádřena následující obecnou rovnicí: $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$. Během této reakce samotné SOD podstupují tzv. „ping-pong“ efekt, to znamená, že se jejich centra obsahující ionty železa nejprve redukují a následně se oxidují (Abreu a Cabelli 2010).

SOD1 je tvořena dvěma stejnými podjednotkami, obě mají jako základ β -barelu. Každá z těchto podjednotek obsahuje vazebné místo, na které se váže jeden ion mědi a jeden ion zinku. Oba kovové ionty jsou spojeny přes histidin 61. Ion mědi je tím redox aktivním kovem, který během katalytické reakce mění svůj oxidační stav. Zinečnaté ionty naproti tomu oxidační stav nemění, ale zase udržují stabilitu celého enzymu a jeho nezávislost na pH (Abreu a Cabelli 2010), stejně tak jako jeho termostabilitu (Potter et al. 2007). Ionty mědi jsou pro funkci SOD1 kriticky důležité a nenahraditelné. Nedostatek mědi v přijímané potravě se projevuje snížením aktivity SOD1, a to jak v játrech, tak v krevních erytrocytech potkanů. O něco pozvolnější pokles v aktivitě SOD1 byl na základě přijímané stravy zaznamenán v mozkové tkáni. V závislosti na chybějící mědi v potravě klesala také tělesná hmotnost zvířat. Zvířata s jejím silným nedostatkem taktéž více umírala, a to pravděpodobně kvůli lézi levé srdeční komory (Bertinato et al. 2003). Pozorovány byly i projevy znaků anémie, a jaterní pokles koncentrace mědi kompenzovaný nárůstem koncentrace železa. S nedostatkem iontů mědi stoupá také exprese chaperonu mědi pro SOD1 (CCS), který zprostředkovává její inzerci do SOD1 (West a Prohaska 2004).

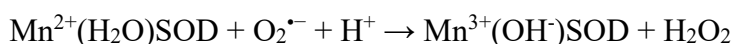
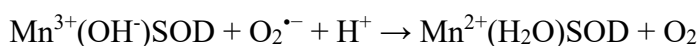
U zdravých myších jedinců se SOD1 váže na GTPázu Rac1, vazba a disociace SOD1 závisí na lokálním redoxním stavu. To znamená, že v redukujícím prostředí se SOD1 na Rac1 naváže, stabilizuje Rac1 a zabraňuje tak hydrolýze GTP. Rac1 aktivuje navázanou NADPH oxidázu 2 (NOX2), která přispívá k produkci $O_2^{\bullet-}$. Ten je rovnou pomocí SOD1 dismutován na H_2O_2 . Zvýšená koncentrace H_2O_2 navozuje oxidující podmínky, které vedou k odvázní SOD1 od Rac1, hydrolýze GTP na GDP a P_i a inaktivaci komplexu NOX2. Celý cyklus se může znovu a znovu opakovat. V tomto procesu je doložena schopnost SOD1 regulovat aktivaci

a aktivitu komplexu Rac1/NOX2. Pokud je však SOD1 mutována, jako tomu bývá u amyotrofické laterální sklerózy (ALS), nedokáže se SOD1 od Rac1 odvázat. Komplex Rac1/NOX2 tak zůstává stále aktivovaný a dochází k neustálé nadměrné produkci $O_2^{\bullet-}$ v mozku, míše a z části i v játrech (Harras et al. 2008).

Snížení exprese SOD1 bylo pozorováno u ApoE-deficientních myší, to znamená u myší bez apolipoproteinu E, které jsou náchylné k akumulaci plaku v cévách a ateroskleróze (Husain et al. 2010). Heterozygotní myši s knock-outem genu pro syntázu kyseliny lipové zkřížené s ApoE-deficientními jedinci vykazovaly snížení v expresi genu pro SOD1, nejsignifikantnější u samců (Yi et al. 2010).

Overexprese lidské SOD1 v myším srdci snižuje následky I/R poškození, jakými jsou například produkce $O_2^{\bullet-}$ a TNF- α , prozánětlivá odpověď a apoptóza kardiomyocytů. Stejně tak působí i proti I/R poškození koronárních tepen transplantovaného srdce, tedy tzv. koronární nemoci štěpu, ke které často dochází po jednom roce od transplantace. SOD1 snižuje poškození tohoto srdečního štěpu (Tanaka et al. 2004). Chronická kontinuální normobarická hypoxie (24 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) zvýšila v srdci potkana mRNA transkript SOD1 (Kasparova et al. 2015).

SOD2 je, jak jsme již zmínili, intracelulárním homotetramerním enzymem. Dva její monomery tvoří funkční dimer. Každý z monomerů se skládá z několika α -helikálních domén na N-konci, dále pak z α/β domén s centrálním β -listem a nakonec dalšími α -helikálními doménami na C-konci. Dva dimery spolu tvoří těsný tetramer (Kang et al. 2011). Pro svou aktivaci vyžaduje SOD2 mitochondriální lokalizaci, v mitochondrii totiž dochází k její metylaci manganem. Aby mohla být SOD2 aktivována i v cytosolu, bylo by třeba dodat vysoké až toxické množství manganu (Luk et al. 2005). SOD2 katalyzuje dvě ireverzibilní reakce oxidačně-redukčního cyklu (Perry et al. 2009), které byly shrnuté v jedné výše zmíněné obecné rovnici.



SOD2 se dále v nukleoidech váže s pomocí iontových sil přímo na mitochondriální DNA a zajišťuje tak její antioxidační ochranu před poškozením $O_2^{\bullet-}$ (Kienhöfer et al. 2009).

Myši s delecí SOD2 zemřely 8-10 dní po narození a vykazovaly silnou retardaci růstu. Heterozygotní jedinci projevovali v srdci aktivitu SOD2 sníženou na polovinu oproti zdravým jedincům, kupodivu podobné snížení aktivity bylo zaznamenáno i v SOD1. Dále pak byla u většiny těchto jedinců pozorována lipidová peroxidace způsobená ROS, formace nitrotyrosinu, akumulace lipidových kapek, tvorba mitochondriálních klastrů, mitochondriální

swelling a ztráta krist, praskání mitochondriální membrány, aktivace apoptotických signálních drah a zřetelné poškození myokardu (Strassburger et al. 2005).

SOD2 kooperuje s TNF- α , který stimuluje u makrofágů tvorbu $\cdot\text{OH}$ a $\text{O}_2^{\cdot-}$. Vzniklé $\text{O}_2^{\cdot-}$ jsou pak zodpovědné za TNF- α indukovanou aktivaci nukleárního faktoru kappa B (NF- κB) (Suwei et al. 1999). Buňky se potřebují nadprodukovaného $\text{O}_2^{\cdot-}$ zbavit, tak možná není náhodou, že TNF- α indukuje expresi genu pro SOD2 (Liu et al. 2000). Toxicita TNF- α se projevuje až v přítomnosti apoptózu indukujícího cykloheximidu. Buněčné linie s nadměrnou expresí SOD2 vykazují zvýšenou rezistenci vůči této toxicitě (Wong et al. 1989).

V srdečních mitochondriích je SOD2 aktivnější než v mitochondriích jaterních, to kvůli vysoce aerobnímu metabolismu v srdci. Aktivita SOD2 v mitochondriích obou tkání se v následujícím experimentu snižovala během hypoxie. Současné dodání vápenatých a hořečnatých iontů vyvolalo zvýšení aktivity SOD2 o 66 % v jaterních mitochondriích za normoxických podmínek a o 43 % za hypoxických podmínek, naproti tomu stejná koncentrace přidaných iontů zvýšila v srdečních mitochondriích za normoxie aktivitu o 22 %, za hypoxie o 23 % (Pérez-Vázquez et al. 2002).

Jedním z projevů stárnutí je mitochondriální dysfunkce, ke které dochází z důvodu nahromadění ROS a oxidativního poškození. Jak jsme se již zmínili, v srdci nacházíme dva typy mitochondrií: subsarkolemální a interfibrilární. U interfibrilárních mitochondrií s věkem výrazně stoupá hladina oxidativního stresu, u mitochondrií subsarkolemálních k tak výraznému vzestupu nedochází. U obou těchto mitochondriálních populací byl zjištěn na věku závislý signifikantní nárůst aktivity SOD2 (Judge et al. 2005). V sluchovém kortexu potkana bylo ukázáno, že se SOD2 váže společně se sirtuinem 3, který ji deacetyluje a tím zvyšuje její aktivitu. S přibývajícím věkem zde ale SOD2 i sirtuinu 3 ubývá. Přítomná SOD2 je acetylována, její aktivita snížena a dochází k hromadění ROS a oxidativního stresu. Následkem toho dochází k s věkem spojené dysfunkci centrálního sluchového systému (Zeng et al. 2014).

ApoE-deficientní myši náchylné k ateroskleróze vykazovaly zvýšení exprese SOD2 (Husain et al. 2010). Myši s heterozygotním knock-outem genu pro syntázu kyseliny lipoové zkřížené s ApoE-deficientními jedinci naopak její snížení, nejmarkantnější znovu u samců (Yi et al. 2010). Fyzické cvičení indukovalo vzestup aktivity SOD2, i když nemělo kupodivu vliv na SOD1, a chránilo tak proti I/R poškození (Yamashita et al. 1999) a srdečním arytmiím (Hamilton et al. 2004). Myši s delecí SOD2 v srdci se dožily maximálně čtyř měsíců života a zemřely na dilatační kardiomyopatii a srdeční selhání. Pozorováno bylo také narušení mitochondriální architektury, snížení aktivity komplexu I a komplexu V dýchacího řetězce, zvýšení tvorby ROS a peroxidace lipidů (Sharma et al. 2020). Režim kontinuální normobarické

hypoxie (24 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) i intermitentní normobarické hypoxie (8 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) navyšoval v srdci potkana hladinu mRNA transkriptu SOD2 (Kasparova et al. 2015).

2.3.1.2. Kataláza

CAT je tetramerickým enzymem, který katalyzuje přeměnu H₂O₂ na kyslík a vodu: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ a zamezuje tak přeměně H₂O₂ na nebezpečné $\cdot\text{OH}$, ke které dochází Fentonovou reakcí (viz Kapitola 2.3.3. Antioxidanty spojené s metabolismem železa). Skládá se ze čtyř stejných proteinových podjednotek, každá podjednotka obsahuje hemovou skupinu s centrálním železem a molekulu nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADPH). Nacházíme ji hlavně v buněčných peroxisomech a ve vysokém množství také v erythrocytech (Safo et al. 2001). Faktor peroxisomální biogeneze 5 směruje nově vzniklé proteiny do peroxisomu. Může se také vázat na monomerní CAT a zabránit tak její tetramerizaci (Freitas et al. 2011). V případě, že tento zmíněný faktor rozpozná nástup oxidativního stresu, zabrání importu CAT do peroxisomu. CAT tedy zůstane v cytosolu, kde úspěšně chrání proti poškození způsobenému vysokou hladinou H₂O₂. Cytosolická CAT totiž dokáže buňky bránit proti H₂O₂ lépe než CAT v peroxisomech (Walton et al. 2017).

Myši s chybějící CAT v následujícím experimentu se podle všeho vyvíjely normálně, byly schopny se rozmnožovat, nevykazovaly vyšší citlivost k hyperoxii, přestože byl zaznamenán pomalejší rozklad extracelulárního H₂O₂. Takoví jedinci však byli citlivější k úrazem vzniklému poškození kortexu, během kterého u nich docházelo k poklesu mitochondriální respirace. Nepřítomnost CAT neměla žádný vliv na aktivitu SOD1, SOD2 nebo GPX, o které se ještě zmíníme (Ho et al. 2004).

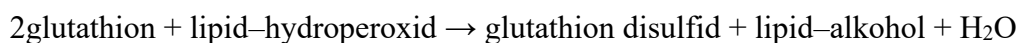
Doxorubicin je lék s chemoterapeutickými účinky, který bývá podáván pacientům s rakovinou. Jeho dlouhodobé užívání má za následek rozvoj chronické kardiomyopatie. Test provedený na myších prokázal, že mnohonásobná nadprodukce CAT by mohla této kardiomyopatii zabránit (Kang et al. 2002). Nadprodukce CAT měla také pozitivní vliv na protekci proti poškození keratinocytů způsobenému ultrafialovým zářením typu B. Hladina ROS se zvyšovala ve dvou fázích, ihned po ozáření a tři hodiny po ozáření. CAT snižovala jejich nárůst ve druhé ze dvou fází. Nízká teplota 4 °C snižovala citlivost k záření a apoptózu podobně jako nadprodukce CAT. Kombinace obojího protektivní efekt ještě posílila (Rezvani et al. 2006).

Transgenní myši s aktivitou CAT v srdci 60x zvýšenou vykazovaly odolnost k I/R poškození. To znamená, že se jejich srdce lépe zotavovala, byla lépe obnovena kontraktilní síla srdce a viditelně redukována velikost infarktu (Li et al. 1997). Jiná práce ukázala,

že trojnásobné zvýšení aktivity CAT v srdci sice nechránilo před infarktem v jeho akutní fázi, signifikantně ale snižovalo hladinu H_2O_2 a redukovalo fibrotizaci srdeční tkáně během chronické fáze srdečního infarktu. Zároveň také měnilo zastoupení kolagenu 1A na kontraktilní izoformu 3A (Pendergrass et al. 2011). Režim kontinuální normobarické hypoxie (24 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) i intermitentní normobarické hypoxie (8 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) však snižoval hladinu mRNA transkriptu CAT v srdci potkana (Kasparova et al. 2015).

2.3.1.3. Glutathionperoxidáza

Další rodinou antioxidantních proteinů je rodina GPX. Dále se budeme zmiňovat o GPX4, jinak také zvané fosfolipidová hydroperoxidáza, která katalyzuje přeměnu hydroperoxidů v reakci:



Cytosolická lidská GPX4 je monomerním proteinem, který se skládá z α -helixů a β -vláken, které formují β -skládaný list a obsahuje ve svém aktivním místě selenocystein. Od ostatních GPX se liší například tím, že nemá na povrch exponovanou smyčku. Právě díky této absenci je ale pravděpodobně schopná tak dobře vázat lipidové molekuly do svého aktivního místa (Imai et al. 1995; Scheerer et al. 2007).

Bylo zjištěno, že GPX4 též přispívá k regulaci ferroptózy, programované buněčné smrti závislé na koncentraci železnatých iontů, přítomnosti lipid-hydroperoxidů a ROS v intracelulárním prostředí. Snížená exprese genu pro GPX4 nebo inhibice aktivity GPX4 je jedním z faktorů, který může vyvolávat spuštění ferroptózy. Systémový lupus erythematosus je autoimunitním onemocněním, při kterém se vlastní protilátky a interferon- α v séru vážou na transkripční represor, který potlačuje expresi genu pro GPX4, a vyvolávají tak ferroptózu neutrofilů (Li et al. 2021). GPX4, která chrání proti ferroptóze buněk zmírňováním peroxidace lipidů, je důležitá i pro přežití pomocných folikulárních T-lymfocytů. Pomocné T-lymfocyty s chybějící GPX4 vykazují totiž silnou ferroptózu doprovázenou lipidovou peroxidací a zmenšováním mitochondrií. Podávání tablet bohatých na selen zvýšilo expresi GPX4 v pomocných T-lymfocytech. A jejich pravidelné užívání po třicet dní před trivalentní chřipkovou vakcinací dokonce zvýšilo aktivitu pomocných T-lymfocytů a podpořilo tak humorální, tedy protilátkovou, imunitu (Yao et al. 2021).

Inkubace oxidovaného HDL a LDL cholesterolu s GPX4 a glutathionem měla za následek redukcí cholesteryl linoleát hydroperoxidu na cholesteryl linoleát hydroxid, podobného účinku se dosáhlo i při užití ebselenu s glutathionem (Sattler et al. 1994). Klinická studie poukázala na to, že včasné podání ebselenu, syntetického léčiva s funkcí podobnou GPX,

by mohlo mít pozitivní účinky pro pacienty s akutní mozkovou ischemickou cévní příhodou a pro jejich rekonvalescenci (Yamaguchi et al. 1998). Ebselen byl též navržen jako nový kandidát na léčbu koronaviru SARS-CoV-2. Ebselen totiž irreverzibilně inhibuje aktivitu papainu podobné proteázy (*papain-like protease*) CoV-2 zmíněného koronaviru (Weglarz-Tomczak et al. 2021).

GPX4 je down regulována v časně a střední fázi rozvoje infarktu myokardu. Snížení její hladiny má za následek nejen hromadění lipidových peroxidů, ale také zvýšení citlivosti kardiomyocytů k ferroptóze (Park et al. 2019). Nadměrná exprese GPX4 v srdečních mitochondriích zase zlepšuje srdeční kontraktlní funkci po globálním I/R poškození myokardu, a to hlavně v období reperfúze. Dále pak během I/R poškození napomáhá k udržování struktury mitochondrií snižováním peroxidace lipidů v jejich membráně, a zvyšuje dokonce i aktivitu komplexů elektronového transportního řetězce, a to komplexu I, III, IV u subsarkolemálních mitochondrií a komplexů I a III u mitochondrií interfibrilárních (Dabkowski et al. 2008). Chronická kontinuální normobarická hypoxie (24 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) zvýšila v srdci potkana taktéž její mRNA transkript (Kasparova et al. 2015).

2.3.2. Enzymy udržující v buňce redox homeostázu

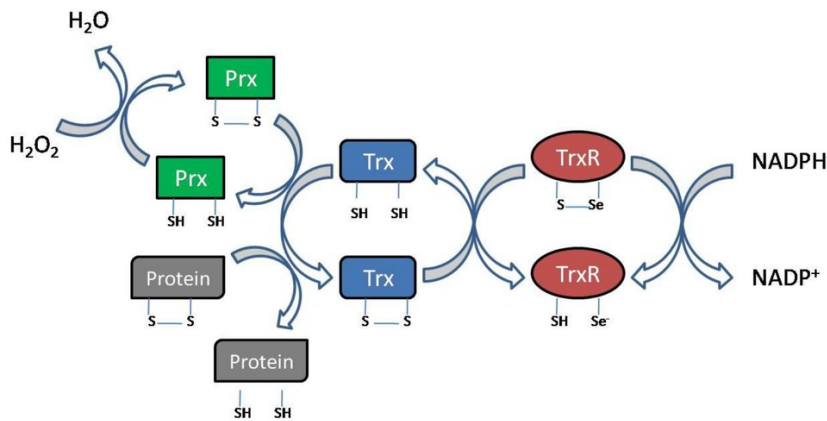
Do následující kategorie enzymů udržujících v buňce redox homeostázu spadají enzymy thioredoxinového i glutathionového systému. V této práci jsme se zaměřili na thioredoxinový systém. TRX redukuje přímo cílové oxidované molekuly, anebo PRDX, které následně redukují H₂O₂. TRX tuto funkci plní pouze tehdy, pokud je sám v redukovaném stavu. Na Obr. 3 je schéma, které znázorňuje funkci thioredoxinového systému a úlohu TXNRD zajišťující redukci TRX v přítomnosti NADPH (Karlenius a Tonissen 2010).

2.3.2.1. Thioredoxin

TRX vykazuje vysoce silný redoxní potenciál. Jak se zdá, již od počátku evoluce katalyzoval TRX redukci v buňce a zároveň se vyvinul s vysokou specifitou pro TXNRD. Sám však předává své elektrony mnoha různým akceptorům (Napolitano et al. 2019). Rozeznáváme obvykle dvě hlavní izofomy TRX: cytosolický TRX1 a mitochondriální TRX2 (Zhang et al. 2004; Zhou et al. 2007).

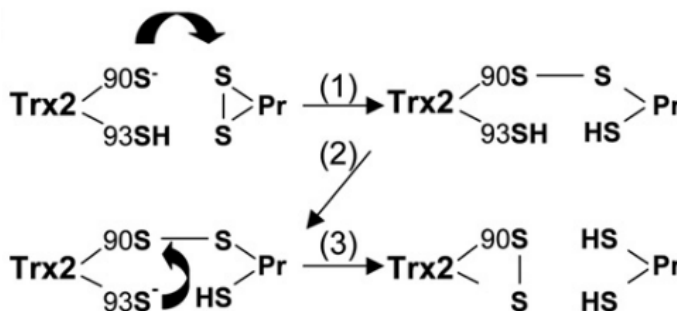
Pro redukční funkci TRX1 jsou důležité cysteinové zbytky 32 a 35 v jeho aktivním místě (Weichsel et al. 1996). Aktivní místa TRX2 se nacházejí na cysteinech 90 a 93. Přes cystein 90 se cílový oxidovaný protein pomocí disulfidických můstků s TRX2 spojuje. Cystein 93 následně vzniklý disulfid redukuje za uvolnění oxidovaného TRX2 a redukovaného cílového

proteinu (Obr. 4). Pokud je TRX2 mutován v cysteinu 93, TRX2 tvoří s cílovým proteinem stabilní disulfidy (Zhang et al. 2007), které nejsou schopny disociace (Zhang et al. 2004).



Obr. 3: NADPH je donorem elektronů, které daruje oxidované thioredoxinreduktáze (TrxR, také TXNRD), tu tímto způsobem redukuje. Redukovaná thioredoxinreduktáza může následně redukovat thioredoxin (Trx, také TRX). Thioredoxin redukuje buď oxidované proteiny, anebo oxidovaný peroxiredoxin (Prx, také PRDX). Peroxiredoxin pak může přímo katalyzovat redukcí peroxidu vodíku na vodu (převzato z Karlenius a Tonissen 2010).

TRX1 bývá během oxidativního stresu translokován z cytoplasmy do jádra (Ueno et al. 1999). Předpokládá se, že jaderný kompartment je lépe chráněn proti oxidativnímu stresu než cytoplasmatický nebo mitochondriální. K tomu nejspíše přispívá právě i TRX1 (Go et al. 2007).



Obr. 4: Redukovaný thioredoxin 2 (Trx2, také TRX2) se pomocí iontu síry (S) na cysteinu 90 spojí s oxidovaným cílovým proteinem (Pr) a vytvoří s ním disulfid Trx2-(S-S)-Pr (reakce 1 a 2). Cystein 93 pak vzniklý disulfid redukuje za uvolnění oxidovaného Trx2 a redukováného cílového proteinu (reakce 3) (převzato z Zhang et al. 2007).

Jak jsme již zmínili, TRX redukuje cílové proteiny. Mezi ně patří například tumor supresorový protein 53 (p53), který zastává funkci senzoru poškození DNA. Jeho vazebná aktivita je totiž silně závislá na redoxním stavu a bez redukujícího prostředí ztrácí schopnost tvořit komplexy s DNA. TRX1 tak svou redukční aktivitou přímo napomáhá DNA vazbě p53. Nebo pak také posiluje redoxním faktorem 1 (Ref-1) zprostředkovanou vazebnou aktivitu p53 (Ueno et al. 1999). TRX1 a Ref-1 funkčně spolupracují i v dalším případě. Po translokaci TRX1 do jádra se totiž TRX1 a Ref-1 spojují přes aktivní centrum TRX1 a vykazují katalytickou

funkci pro aktivaci transkripčního faktoru zvaného aktivátorový protein-1 (AP-1) (Hirota et al. 1997).

TRX1 se také přes své aktivní místo spojuje pomocí intermolekulárních disulfidických můstků s cysteinovým zbytkem 250 velmi zásadní proapoptotické kinázy, tedy kinázy regulující apoptotický signál (ASK1). TRX1 tvoří s ASK1 komplex a zabraňuje aktivaci ASK1. Tento komplex je narušen přítomností TNF a H₂O₂. Disociaci pak zabraňuje podání antioxidantu N-acetylcysteinu před vystavením TNF. Jak se tedy zdá, ROS zapříčiňují disociaci komplexu TRX1 s ASK1 tím, že TRX1 oxidují, a TNF vyvolá aktivaci ASK1 (Liu a Min 2002). Dochází tak ke spuštění apoptotické dráhy přes ASK1, která je závislá na c-Jun N-terminální kináze (JNK), dále pak ke štěpení proteinu Bid, translokaci proapoptického Bax na mitochondrie, následnému uvolňování cytochromu c a aktivaci kaspázy 3, která spouští apoptotické děje (Obr. 5 vlevo) (Zhang et al. 2004).

TRX1 je též sérovým rakovinným markerem, a to především pro rakovinu prsu (Park et al. 2014). Jeho hladina je totiž významně zvýšena jak během rakovinného bujení, tak během tvorby metastáz. Inaktivace TRX1 pak snižuje buněčnou invazi, tedy jeden z kroků tvorby metastáze (Bhatia et al. 2016). Pokud je TRX1 inaktivní, to znamená, že je mutována v cysteinech 32 a 35, dochází v nádorových buňkách k silnému úbytku hypoxií indukovaného faktoru 1 α (HIF-1 α), stejně tak jako snížení jeho aktivity a aktivity vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (Welsh et al. 2002).

Jak jsme se již dříve zmínili, některé chemoterapeutické léky mohou mít zároveň nepříjemné kardiotoxické účinky. U dětských pacientů, kteří překonali rakovinu, se tak mohou později rozvinout závažné srdeční problémy nebo může dojít dokonce k srdečnímu selhání. Overexprese TRX1 snižuje tuto kardiotoxicitu a zároveň zlepšuje toxicitu chemoterapeutických léků pro buňky rakovinné (Das et al. 2021).

Myši s delecí TRX1 se dožily v průměru jen 25,5 dne. Delece způsobila srdeční oxidativní stres a snížení exprese genů důležitých pro metabolismus mastných kyselin, citrátový cyklus a elektronový transportní řetězec, dále pak změnila morfologii mitochondrií, inhibovala mitochondriální respiraci a promotorovou aktivitu metabolických genů. To vše mělo za následek srdeční kontraktilní dysfunkci, systolickou dysfunkci, sníženou ejekční frakci levé komory a sníženou tloušťku stěny komory, dále pak srdeční hypertrofii, fibrózu, buněčnou apoptózu a nakonec srdeční selhání (Oka et al. 2020).

TRX2 je mitochondriálním thioredoxinem. Jak je známo, mitochondrie jsou hlavním zdrojem tvorby ROS. Antioxidační funkce TRX2 je tedy velmi důležitá, může ale být také částečně kompenzována glutathion/glutathionperoxidázovým systémem (Tanaka et al. 2002).

TRX2 je nezbytný pro embryonální vývoj a buněčné dýchání. Myší embrya s genem pro TRX2 umlčeným pomocí homozygotní mutační inserce nebyla životaschopná. Neměla uzavřenou anteriorní neurální trubici, naproti tomu posteriorní neurální trubice se zdála být uzavřená bez jakýchkoli problémů. Dále byla pozorována silná apoptóza. Pro taková embrya byla letální ta doba, ve které mají dozrávat mitochondrie a ve které by tak mělo začínat docházet k oxidativní fosforylaci (Nonn et al. 2003).

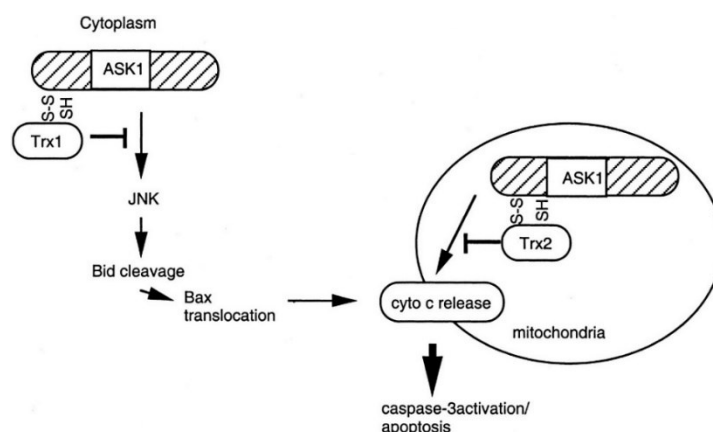
Overexprese TRX2 snižuje hypoxií vyvolanou akumulaci HIF-1 α , v tomto případě tedy pracuje opačně než TRX1. Nadbytek TRX2 také snižuje hladinu fosforylované PKB/Akt (Zhou et al. 2007). TRX2 též chrání proti buněčné smrti způsobené podáním TNF s cykloheximidem (Zhang et al. 2007). Dále pak potlačuje jadernou translokaci NF- κ B a také aktivitu prozánětlivé dráhy NF- κ B regulovanou právě pomocí TNF- α (Hansen et al. 2006).

Hypoxický preconditioning zvýšil expresi TRX2 jak v předním mozku (Stroev et al. 2004), tak v srdci, v něm jak v režimu kontinuální normobarické hypoxie (24 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂), tak i v režimu intermitentní normobarické hypoxie (8 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) (Kasparova et al. 2015). Overexprese TRX2 během I/R nevykazovala v myších srdcích žádné velké postischemické kardioprotekční účinky, naproti tomu její reduktáza, o které budeme ještě dále mluvit, se ukázala být v tomto případě zásadní (Horstkotte et al. 2011).

TRX2, podobně jako TRX1, tvoří komplex s ASK1, ale na rozdíl od TRX1 ho tvoří v mitochondriích. Narušení komplexu vede též k aktivaci ASK1 a spuštění apoptotické dráhy, v tomto případě však na JNK nezávislé. Stejně jako výše zmíněná na JNK závislá dráha v cytosolu spouští tato dráha v mitochondrii uvolňování cytochromu c z mitochondrie a aktivaci kaspázy 3, která spouští apoptózu (Obr. 5 vpravo) (Zhang et al. 2004). Nadprodukce TRX2 potlačuje funkci TNF- α v buňkách (Hansen et al. 2006). TRX2 je nepostradatelně důležitý pro srdce. Lidská srdce trpící dilatační kardiomyopatií se vyznačují sníženou hladinou TRX2 a zvýšenou aktivitou ASK1. U myši se srdeční delecí TRX2 se rozvíjí již v prvním měsíci života dilatační kardiomyopatie, která je provázená zhoršenou funkcí levé komory, srdeční hypertrofií, dilatací komor i síní, a na věku závislém zvětšení kardiomyocytů, dále pak srdeční mitochondriální depolarizací a narušením mitochondriální ultrastruktury, zvýšenou mitochondriální produkcí ROS a sníženou produkcí ATP. Celý tento proces byl zároveň provázen zvýšenou autofosforylací ASK1, produkcí ROS a apoptózou kardiomyocytů. K srdečnímu selhání a smrti těchto jedinců docházelo do čtvrtého měsíce života. Inhibice ASK1 pak vedla ke zlepšení celkového srdečního fenotypu a snížení oxidativního stresu a apoptózy (Huang et al. 2015).

TRX může také redukovat již zmíněné PRDX. Ty mají vysokou afinitu pro H_2O_2 a mohou ho následně přímo redukovat na vodu a snižovat tak oxidativní stres a množství ROS. PRDX se vyskytuje v šesti izoformách. V mitochondrii byly nalezeny dvě, a to PRDX3 a PRDX5. TRX2 však spolupracuje pravděpodobně pouze s PRDX3 a poskytuje mu své elektrony. PRDX3 pak přispívá vysokou měrou k ochraně mitochondrie před oxidativním stresem (Zhang et al. 2007).

Obr. 5: Vlevo: Thioredoxin 1 (Trx1, také TRX1) tvoří v cytosolu komplex s kinázou regulující apoptotický signál (ASK1) a udržuje tak tuto kinázu v inaktivovaném stavu. Proapoptotický stimul, jakým je například faktor tumorové nekrózy s cykloheximidem a peroxid vodíku, má za následek disociaci komplexu, aktivaci ASK1 a její zapojení se do na c-Jun N-terminální kináze (JNK) závislé apoptotické dráhy, která přes štěpení proteinu Bid a translokaci proteinu Bax na mitochondrie spouští výlev cytochromu c z mitochondrie, a nakonec aktivaci proapoptotické kaspázy 3.



Vpravo: Thioredoxin 2 (Trx2, také TRX2) tvoří v mitochondrii komplex s ASK1 a udržuje tak tuto kinázu v inaktivovaném stavu. Faktor tumorové nekrózy a peroxid vodíku se podílí na disociaci tohoto komplexu. Mitochondriální ASK1 není zapojena do na JNK závislé apoptotické dráhy. Místo toho spouští rovnou výlev cytochromu c z mitochondrie a aktivuje taktéž kaspázu 3 (převzato z Zhang et al. 2004).

PRDX v srdci procházejí během oxidativního stresu strukturálními změnami. Pokud totiž není například PRDX1 vystaven oxidativnímu stresu, vyskytuje se ve formě monomeru, v přítomnosti H_2O_2 pak začne tvořit disulfidové dimery. Velká část PRDX2 a PRDX3 se naproti tomu vyskytuje ve formě dimerů už v bazálním stavu. V případě vysokého oxidativního stresu vytvořila jak část PRDX1, tak část PRDX2 dokonce oligomery. PRDX5 podle všeho netvoří dimery ale pouze několik různých monomerů, místo intermolekulárních totiž tvoří intramolekulární disulfidové vazby. PRDX6 jako jediný nevykazuje jako odpověď na H_2O_2 žádnou zásadní strukturální změnu (Schröder et al. 2008). PRDX1 se spolu s TRX1 ve velkém množství vyskytuje v prsní rakovinné tkáni (Cha et al. 2009), PRDX3, PRDX5 a PRDX6 zase v ovariální rakovinné tkáni. PRDX se tak ukazují být dobrým diagnostickým rakovinným markerem (Li et al. 2018). Ukázalo se také, že PRDX2 je negativním regulátorem signalizace destičkového růstového faktoru a může tak potlačovat nebezpečnou aterosklerózu. Stejný účinek nevykazuje CAT ani GPX, které rovněž redukují H_2O_2 (Choi et al. 2005). V režimu chronické kontinuální normobarické hypoxie (24 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO_2) byla v srdci potkana zaznamenána zvýšená hladina mRNA transkriptu PRDX2 a PRDX5. Intermittentní

normobarická hypoxie (8 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) zase navýšila mRNA transkript PRDX2 a PRDX6 (Kasparova et al. 2015).

2.3.2.2. Thioredoxinreduktáza

TXNRD se pravděpodobně vyvíjela společně s TRX, to je také důvodem silné specifity TRX pro TXNRD (Napolitano et al. 2019). Stejně jako je tomu u TRX, TXNRD1 se vyskytuje v cytoplasmě a TXNRD2 je mitochondriálním proteinem. TXNRD patří do skupiny proteinů obsahujících selenocystein. Deficience selenu ve stravě měla v játrech potkana za následek snížení aktivity TXNRD na 15 % a hladiny jeho mRNA na 70 % (Hadley a Sunde 2001). Nedostatek selenu ve stravě znamenal dokonce sníženou expresi obou TXNRD, GPX1 a GPX4 a PRDX2 v srdcích potkaních samečů, která prodělala ischemii a reperfúzi. Jejich srdce byla také náchylnější k I/R poškození. Podávání potravy s vysokým obsahem selenu znamenalo zvýšení exprese všech jmenovaných proteinů. Zvláštní výjimkou byl TRX1, který navýšil svou expresi jak při nedostatku selenu, tak při jeho nadbytku (Venardos et al. 2005).

Narušení genu pro TXNRD1 způsobuje u myši embryonální letalitu. Pozorována byla retardace růstu způsobená silně sníženou buněčnou proliferací, zkrácení anterior-posteriorní osy, narušená somitogeneze a problémy s uzavřením neurální trubice. Srdce se zdálo být jediným orgánem, který nebyl nijak ovlivněný, a to ani růstovou retardací. Zdá se tedy pravděpodobné, že TXNRD1 nijak nezasahuje do embryonálního vývoje srdce (Jakupoglu et al. 2005).

Infarktem zasažená potkaní srdce měla sníženou hladinu proteinu TXNRD1 a jeho mRNA exprese, aktivita TXNRD1 byla nižší o 32 %. Zajímavé je, že aktivita TRX1 zde naopak stoupla o 51 % a hladina tohoto proteinu byla také značně navýšena. Jeho mRNA exprese však výrazně změněna nebyla (Li et al. 2008).

TXNRD2 je nezbytně důležitým mitochondriálním proteinem nepostradatelným ve vývoji jedince. Homozygotní delece genu pro TXNRD2 je letální již v embryonálním myším stádiu, a to mezi 12,5 a 13,5 dny embryonálního vývoje. Takováto embrya byla o poznání menší a anemická, céva vyživující žloutkový váček a vyvíjející se embryonální mozek byla méně zásobena krví. Dále byla pozorována dysplázie srdeční tkáně, ztenčení myokardu komor a snížená proliferace kardiomyocytů. Nakonec byla taktéž zaznamenána změna morfologie jaterní tkáně a zvýšená apoptóza jejích buněk. TXNRD2 je nezbytně důležitá pro správný srdeční vývoj, jak ukázaly specifické srdeční delece genu pro TXNRD2. Myši s takovou delecí byly již životaschopné, ale trpěly na městnavé srdeční selhání, generalizovaný edém nebo dilataci srdečních síní a ztenčení myokardu komor. Cytosol buněk myokardu byl vakuolizován,

pozorován byl i mitochondriální swelling a ztráta krist (Conrad et al. 2004). Srdce se specifickou delecí genu pro TXNRD1 se v embryonálním vývoji naproti tomu formovala běžně (Jakupoglu et al. 2005).

TXNRD2 je taktéž důležitá pro protekci srdce po ischemii. I/R poškození srdce mělo u myších jedinců s nefunkční TXNRD2 v srdci na svědomí ztrátu mitochondriální integrity, sníženou aktivitu mitochondriální ACO2 a větší velikost infarktu. Naproti tomu funkční TXNRD2 navíc zabraňovala otevírání mPTP. Zajímavé je, že snížení hladiny TXNRD2 v srdci mělo za následek zvýšení hladiny TRX2 (Horstkotte et al. 2011). Podobný kompenzační efekt byl pozorován i u pacientů s dilatační kardiomyopatií s redukovanou hladinou TRX2, hladina TXNRD2 u nich byla naopak silně zvýšena (Huang et al. 2015). Naproti tomu například embrya s homozygotní celoorganismální mutací genu pro TRX2 nevykazovala detekovatelné množství ani TXNRD2 (Nonn et al. 2003).

Hladina mRNA transkriptu TXNRD2 v srdci potkana viditelně stoupla jak během kontinuální normobarické hypoxie (24 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂), tak i v režimu intermitentní normobarické hypoxie (8 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) (Kasparova et al. 2015).

2.3.3. Antioxidanty spojené s metabolismem železa

V přítomnosti železnatých iontů a nadměrného množství H₂O₂ se setkáváme s tzv. Fentonovou reakcí: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$ V této reakci dochází k oxidaci železa a zároveň k produkci nebezpečného a vysoce reaktivního $\cdot OH$. Mezi antioxidanty spojené s metabolismem, které regulují množství železa a tím tak přinášejí antioxidační funkci, patří izoformy enzymů ACO a HMOX.

2.3.3.1. Akonitáza

ACO nebo také akonitát hydratáza katalyzuje reverzibilní přeměnu citrátu na cis-akonitát a cis-akonitátu na isocitrát. ACO ve své struktuře obsahuje železo-sírné klastry. Rozeznáváme její dvě hlavní formy: cytoplasmatickou ACO1, nazývanou také regulační protein železa 1, a mitochondriální ACO2. Jak bylo ukázáno na ACO prasečího srdce exprimované v *Escherichia coli*, ACO má několik aminokyselinových zbytků nezbytných pro svou funkci. Zmíníme si zde jen několik z nich. Arginin 580 je zásadní pro navázání substrátu na ACO, aspartát 165 zase pro interakci substrátu se železem z akonitázového klastru. Histidin 101 protonuje hydroxylovou skupinu substrátu, aspartát 100 pak podporuje funkci histidinu 101. Serin 642 je důležitý pro odstranění protonu z citrátu nebo isocitrátu při dehydratačním kroku a pro protonaci cis-akonitátu během kroku hydratačního (Zheng et al. 1992). S pomocí kvasinkové kultury byla zkoumána také mutace ACO1, a to přesněji mutace v serinu 711

způsobená fosforylací. Taková mutace zapříčiňovala prakticky nedetekovatelnou funkci ACO1 v přeměně citrátu na isocitrát. Naopak funkce přeměny isocitrátu na cis-akonitát se zdála být z větší míry zachována (Pitula et al. 2004).

ACO1 funguje dvěma způsoby v závislosti na přítomnosti iontů železa uvnitř buňky. V jejich malé koncentraci funguje jako regulační protein železa 1. To znamená, že se váže na „stem-loops“ elementů responzivních na železo. Brání tak expresi proteinů vázajících železo a inhibuje degradaci transferinových receptorů. Ve vysoké koncentraci železa v buňce vykazuje naopak akonitázovou aktivitu s aktivním železo-sírným klastrem. Dochází pak k translaci proteinů vázajících železo, například ferritinu. Naopak transferin zůstává degradován. Ztráta atomu železa z klastru vede k inaktivaci akonitázové funkce, ne však ke spuštění funkce regulační, pro tu jsou tedy nutné další úpravy proteinu ACO1 (Haile et al. 1992; Kennedy et al. 1992; Yu et al. 1992).

Kardioprotektivní režim normobarické hypoxie (8 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) zvýšil expresi mRNA transkriptu ACO1 v srdcích potkanů (Kasparova et al. 2015).

Mitochondriální ACO2 je klíčovou součástí Krebsova cyklu. ACO2 obsahuje ve své struktuře důležité železosírné klastry [4Fe-4S]²⁺, pokud je inaktivována, jeden ion železa v klastru postrádá [3Fe-4S]¹⁺. Pro stabilitu klastrů jsou podstatné tři cysteinové zbytky. Sukcinací těchto cysteinových zbytků může docházet k inhibici ACO2. Ta nastává i při mutaci fumarázy u závažné nemoci zvané karcinom ledvin spojený s dědičnou leiomyomatózou (Ternette et al. 2013). ACO2 je ze všech enzymů Krebsova cyklu tím, jehož aktivita klesá s věkem nejvíce a podléhá tak stárnutí. To ovlivňuje nejenom bioenergetiku mitochondrií, ale i tvorbu meziproductů Krebsova cyklu a syntézu proteinů, mastných kyselin nebo receptorových ligandů (Yarian et al. 2006).

ACO2 funguje jako senzor oxidativního stresu, neboť je velmi citlivá na přítomnost ROS, a to jak O₂^{•-} tak H₂O₂. V jejich přítomnosti dochází k její inaktivaci (Gardner et al. 1995; Vásquez-Vivar et al. 2000; Bulteau et al. 2003). Inaktivace ACO2 vyvolá uvolnění železa z klastru, které se spolu s H₂O₂ významně podílí na Fentonově reakci (Vásquez-Vivar et al. 2000). Tvorbě [•]OH Fentonovou reakcí může zabraňovat chelátor železa, který je schopný železo vázat (Vásquez-Vivar et al. 2000).

K obnovování funkce ACO2 může docházet postupně v přítomnosti citrátu, enzymatického substrátu Krebsova cyklu, pokud došlo k dostatečnému poklesu H₂O₂. Funkce však není obnovena zcela, jen na přibližně 80 % původních hodnot, pravděpodobně kvůli částečné degradaci inaktivované ACO2 (Bulteau et al. 2003). Na srdci potkana pak bylo ukázáno, že dodání i jen nepatrné koncentrace hořčičných iontů výrazně zvyšuje poměr

citrát/isocitrát. Dodání vápenatých iontů vykazovalo taktéž zvýšení zmíněného poměru, ne však tak rychlé a výrazné (England et al. 1967). ACO₂ může být dále aktivována dodáním železnatých iontů (Kennedy et al. 1992). V některých případech může dokonce i nadprodukce SOD2 zabránit inaktivaci ACO₂, avšak to neplatí v podmínkách normobarické hyperoxie (Gardner et al. 1995).

Dětští pacienti s homozygotní, nebo složenou heterozygotní mutací měnící smysl nebo čtecí rámeček v genu kódujícím ACO₂ trpí mnoha vývojovými a psychickými problémy. Mezi ně mohou patřit deprese, úzkosti, ataxie, někdy i kvadruplegie, dále pak opožděný mentální vývoj, porucha řeči, atrofie optického nervu, hypoplazie koncového mozku a jeho degenerace. S novými pacienty bývají zaznamenány také nové symptomy těchto závažných poruch. Ukazuje se také jak důležitá je správná diagnostika jejich mírnějších forem, které často nejsou ani rozpoznány (Metodiev et al. 2014; Blackburn et al. 2020).

Během I/R nedocházelo v potkaních srdečních mitochondriích ke změně hladiny ACO₂. Docházelo však k viditelné a reverzibilní změně její aktivity způsobené reverzibilní oxidativní modifikací jejího sulfhydrylového zbytku. Během prvních pěti minut reperfúze se aktivita ACO₂ snížila na 65 %. Prodloužená reperfúze však znamenala opětovný vzestup její aktivity. ACO₂ je chráněna pomocí železo vázajícího proteinu frataxinu před vlastním rozložením vyvolaným oxidativním stresem. Podobně je ACO₂ chráněna i citrátem. Díky přítomnosti frataxinu není ACO₂ irreverzibilně inaktivována a nebo dokonce degradována, a může být následně znovu aktivována (Bulteau et al. 2005). Pacienti postižení selháním srdce měli nižší celkový obsah železa v srdeční tkáni, s tím souvisel i viditelný vzestup exprese transferinových receptorů. Aktivita ACO₂ a také citrátsyntázy, tedy dalšího enzymu Krebsova cyklu, tak byla viditelně snížena (Melenovsky et al. 2016; Sheeran a Pepe 2016).

Transkripce mRNA ACO₂ v srdci potkana stoupla během chronické kontinuální normobarické hypoxie (24 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) i intermitentní normobarické hypoxie (8 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂). Navýšena byla dokonce i v jinak neprotektivním režimu intermitentní normobarické hypoxie (23 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) (Kasparova et al. 2015).

2.3.3.2. Hemoxygenáza

HMOX se vyskytuje ve dvou hlavních izoformách, těmi jsou indukibilní HMOX1 a konstitutivní HMOX2. HMOX je velmi důležitým enzymem, který katalyzuje rozklad hemu na biliverdin, který může být následně redukován na bilirubin, za současného uvolnění železnatého iontu a oxidu uhelnatého (CO) (Collino et al. 2013).

Hem je součástí hemoproteinů, jakými jsou například hemoglobin nebo myoglobin. Aby v těle nezůstával jako produkt rozpadu červených krvinek samotný hem, jejich hemoglobin je fagocytován makrofágy. HMOX1 jako enzym zakotvený v endoplazmatickém retikulu směřuje do cytosolu (Gottlieb et al. 2012), železnaté ionty, které zde pak činností HMOX1 vznikají, jsou tak blízko ferritinu a dalším proteinům, které mohou železo ukládat (Cohen et al. 2010). Rozklad hemu, je velmi důležitý, v přebytku totiž může hem zvyšovat oxidativní stres a jeho akumulace je za ischemických podmínek škodlivá pro srdeční funkci. Selhávající srdce mají hladinu hemu zvýšenou (Sawicki et al. 2015).

Hemoxygenázovou reakcí vzniklý biliverdin se během ischemie vyznačuje antioxidačními, apoptotickými a protizánětlivými účinky, jak bylo ukázáno na izolovaných plicích potkana (Tian et al. 2017) anebo na prasečích játrech (Andria et al. 2013). CO je zase velmi důležitý pro svou funkci v protizánětlivých kaskádách (Wang et al. 2009). Biliverdin i CO blokují akumulaci ROS, fragmentaci DNA a aktivaci apoptotické kaspázy 3 vyvolanou pomocí TNF- α . Tento jev byl zkoumán v cerebrálních mikrovaskulárních endoteliálních buňkách získaných z novorozených prasat (Basuroy et al. 2006).

Zvýšená hladina HMOX1 snižovala hladinu ROS a zmírňovala vaskulární kalcifikaci u chronických onemocnění ledvin (Yang et al. 2021). Cerebrální mikrovaskulární endoteliální buňky novorozených prasat tentokrát s vysoce up regulovnou HMOX1 zase neodpovídaly na TNF- α fragmentací DNA a apoptózou (Basuroy et al. 2006).

Myši s heterozygotním knock-outem genu pro HMOX1 byly náchylnější k I/R poškození, měly větší velikost infarktu a rozsáhlejší myokardiální nekrózu. Dokonce ani IP u nich neměl tak výrazný účinek (Yoshida et al. 2001).

Zdá se také pravděpodobné, že HMOX1 může snižovat škodlivý vliv inzulínové rezistence. Ta se totiž může vyznačovat mimo jiného zvýšením systolického arteriálního krevního tlaku, krevní glukózy, zvýšenou hladinou NO, inducibilní NO syntázy (iNOS), inzulínu, celkového cholesterolu a triglyceridů v séru. Naopak může být pozorováno snížení hladiny CO a eNOS v séru, snížení hladiny SOD a celkové antioxidační kapacity. Ošetření heminem, oxidovanou formou hemu a stimulantem HMOX1, po dobu čtyř týdnů, vyvolalo silnou expresi mRNA HMOX1 a proteinu HMOX1, která vedla ke zvýšení hladiny CO, hladiny SOD i celkové antioxidační kapacity. Dále pak byla pozorována normalizace systolického arteriálního krevního tlaku a aktivity iNOS i eNOS (Yong-song et al. 2008). Heminem indukovaná exprese HMOX1 snížila také tvorbu ROS a migraci s invazí v lidských rakovinných prsních buňkách (Zhu et al. 2017). Podávání heminu bylo použito i u potkaního modelu srdečního selhání. Hemin vyvolal obrovskou expresi a aktivitu HMOX1. Bylo tak

docíleno snížení oxidativního stresu, poklesu apoptózy, peroxidace lipidů, poškození DNA pomocí ROS, aktivity kaspázy 3 a exprese proapoptotického proteinu Bax, snížena byla i produkce prozánětlivých cytokinů TNF- α a interleukinu 1 beta. HMOX1 tak viditelně omezovala myokardiální poškození a zlepšovala přežití (Collino et al. 2013).

Chronická kontinuální normobarická hypoxie (24 h/den, 3 týdny, 0,1 FiO₂) zvýšila v srdci potkana mRNA transkript HMOX1 (Kasparova et al. 2015).

Transgenní myši se srdeční overexpresí „ *δ -aminolevulinic acid synthase*“, která katalyzuje jeden z kroků syntézy hemu, měly za normálních podmínek zvýšenou expresi HMOX1, ne však HMOX2, která zůstala beze změny. HMOX1 zde kompenzačně snižovala nadměrnou tvorbu hemu. Po koronárním podvazu byla již zaznamenána menší exprese HMOX1, ale stále o poznání vyšší exprese než u kontrolních jedinců bez koronárního podvazu. Exprese HMOX2 se ani tentokrát nijak neměnila (Sawicki et al. 2015). HMOX1 udržuje inzulinovou senzitivitu, HMOX2 naproti tomu pravděpodobně přispívá k potlačování glykolýzy a snižování úniku protonů v bílé tukové tkáni (Yao et al. 2020).

Delece genu pro HMOX2 v cerebrálních mikrovaskulárních endoteliálních buňkách novorozentých prasat ukazovala vyšší náchylnost k TNF- α způsobené apoptóze (Basuroy et al. 2006). V jiném experimentu však taková delece naopak ochraňovala neurony před oxidativním poškozením způsobeným heminem (Regan et al. 2004). Hemin, který se může uvolňovat z oxidovaného methemoglobinu, se totiž hromadí například v hematomech při úrazovém poškození mozku a způsobuje konstriktci hladkého svalstva cév a tím pádem může pravděpodobně přispívat k tvorbě spasmů v cerebrálním řečišti (Letarte et al. 1993).

3. Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda nový kardioprotektivní režim mírné chladové aklimace (8 ± 1 °C) zvyšuje kapacitu antioxidačního systému v průběhu aklimačního procesu.

- i) Stanovit hladinu vybraných antioxidačních proteinů u kontrol, po 1-3-10 dnech chladové expozice
- ii) Stanovit hladinu vybraných antioxidačních proteinů u kontrol, po 5 týdnech chladové expozice a následně po 2 týdnech po návratu do kontrolních podmínek

4. Metodika

4.1. Zvířata

K pokusům byli použiti potkaní samci kmene Wistar, chovné jádro Charles River (Velaz s.r.o.). Potkani byli chováni při světelném režimu 12:12, v klecích s dostatečnou podestýlkou byli umístěni po dvou, aby se zamezilo sociálnímu stresu. Přístup k potravě byl *ad libitum*, standardní stravou ST1.

4.2. Akutní chladová aklimace

Potkani byli rozděleni do čtyř skupin. Kontrolní skupina (C, n = 6) byla ponechána v teplotě 24 ± 1 °C po celou dobu experimentu. Tři chladové skupiny byly rozděleny podle toho, po kolik dní byli jedinci vystaveni chladu: 1 den (1D, n = 6), 3 dny (3D, n = 6), 10 dní (10D, n = 6).

4.3. Chronická chladová aklimace

Potkani byli rozděleni do tří skupin. Na kontrolní skupinu (C, n = 8), která byla ponechána v teplotě 24 ± 1 °C po celou dobu experimentu, chladovou skupinu (CA, n = 8) chovanou 1. týden při teplotě 8 ± 1 °C 8 h/den a následující 4 týdny při teplotě 8 ± 1 °C 24 h/den, a regresní skupinu (CAR, n = 8), která byla po 5 týdnech v chladu 8 ± 1 °C chovaná ještě další 2 týdny při teplotě 24 ± 1 °C.

4.4. Odběr orgánů, zpracování vzorků a měření koncentrace proteinů

Po ukončení aklimace byl potkanům podán intraperitoneálně thiopental (v dávce 60 mg/kg tělesné hmotnosti), tedy celkové anestetikum s rychlým nástupem a krátkodobým účinkem. Následně bylo potkanům odebráno srdce, to bylo ponořeno do vychlazeného fyziologického roztoku, a na ledě rozděleno na pravou a levou komoru a septum. Všechny části byly po zvažení řádně označeny, zamrazeny v tekutém dusíku a uchovány v -80 °C pro následné analýzy.

Na přípravu vzorků byly použity levé srdeční komory, ze kterých byl připraven postnukleární supernatant (Ujcikova et al. 2014). Srdeční tkáň byla nastříhána na nerezovém bločku na malé kousky a naředěna s TMES (viz Příloha 1) v poměru 1:5. Následně byly vzorky zhomogenizovány (2 minuty, 1200 rpm; Ultra Turrax T25 basic, IKA Labortechnik) a centrifugovány (10 minut, 2100 rpm, 4 °C; Hettich Universal 320 R, Hettich). Vzniklý supernatant S1 byl odebrán do zkumavek chlazených na ledu. Pelet byl doplněn v poměru 1:5

s TMES, opět zhomogenizován a centrifugován stejným způsobem. Vzniklý supernatant S2 byl přidán k odebranému supernatantu S1 a tento směsný supernatant (S1+S2) byl následně použit k analýzám.

Koncentrace proteinů byla stanovena Bradfordovou metodou. Nejprve byla připravena kalibrační křivka dle protokolu o koncentracích: 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ z roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) (Bio-Rad, USA). Na 96-jamkovou destičku byly nanесeny zmíněné koncentrace BSA a také 10 μl daného vzorku na jamku, vše v tripletech. Do každé jamky bylo následně přidáno 250 μl Bradfordova činidla (Merck, B6916). Poté byla destička zakryta alobalem a 10 minut inkubována při laboratorní teplotě. Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm. Takto změřené vzorky byly následně naředěny na stejnou koncentraci s přidáním vzorkového pufru (viz Příloha 1) a zamrazeny pro další proteinové analýzy. Vzorkový pufr je denaturační pufr za redukcujících podmínek s obsahem SDS a DTT, který zajišťuje částečnou denaturaci proteinů ve vzorku a zároveň dodává proteinům záporný náboj, který je důležitý při separaci proteinů v elektrickém poli.

4.5. SDS elektroforéza

Vzorky byly separovány pomocí SDS elektroforézy (SDS-PAGE) následovně. Nejprve byl připraven 12% dělicí polyakrylamidový gel (viz Příloha 1) o tloušťce 0,75 mm. Gel byl převrstven vrstvou vody, aby došlo k jeho úplné polymeraci. Po zatuhnutí gelu a odstranění vody byl polymerizovaný gel zalit 5% zaostřovacím gelem (viz Příloha 1) s použitím 15-jamkového hřebínku. Hřebínek vytvořil jamky pro nanесení vzorků.

Jednotlivé vzorky byly povařeny po dobu 5 minut při 95 °C, tímto povařením došlo k potřebné denaturaci proteinů. Následně byly vzorky schlazeny 10 minut na ledě, centrifugovány a protřepány. Takto připravené denaturované vzorky byly pomocí jehly Hamilton (Hamilton, USA) nanесeny do jamek v koncentraci 5 μg nebo 10 μg proteinu na jamku. Skla s gely byla umístěna do aparatury Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad) a zalita elektrodovým pufrem (viz Příloha 1). Pro separaci proteinů v gelu byla využita SDS-PAGE při konstantním napětí 150 V a délce 75-140 minut v závislosti na molekulové hmotnosti sledovaného proteinu. Nabité proteiny putovaly v elektrickém poli od záporného pólu ke kladnému pólu a rozdělily se tak v polyakrylamidovém gelu podle své molekulové hmotnosti.

4.6. Western blot

Po skončení SDS-PAGE byl gel spolu s nitrocelulózovou membránou (Bio-Rad, USA), filtračními papíry a blotovacími polštářky 15 minut inkubován s vychlazeným blotovacím pufrem (Towbin) (viz Příloha 1). Vše bylo poskládáno do blotovacího sendviče, který byl vložen do kazet a následně do aparatury Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad) spolu s blokem ledu, a zalit vychlazeným Towbinem. Pomocí western blottingu byly, díky vytvořenému elektrickému poli, proteiny přeneseny z gelu na nitrocelulózovou membránu. Blotovací podmínky byly konstantní: napětí 100 V, 90 min, 4 °C. Přeblovaná membrána byla poté obarvena pomocí barviva Ponceau (viz Příloha 1) a vyfocena pro následné vyhodnocování na celkový protein. Membrána pak byla odbarvena pomocí Tris-pufru s 20% Tween (TTBS, viz Příloha 1) a blokována po dobu jedné hodiny v 5% odtučněném mléce s TTBS. Po hodinové blokaci, byla membrána dobře promyta od zbytků mléka pomocí TTBS. Následně byla přes noc inkubována s primární protilátkou (viz Příloha 2) ve 4 °C. Dalšího dne byla membrána, po promytí TTBS od primární protilátky, inkubována se sekundární protilátkou (viz Příloha 2) po dobu 1 hodiny, při pokojové teplotě. Nadbytečná sekundární protilátka byla poté odmyta opět pomocí TTBS. Proteiny byly vizualizovány s pomocí chemiluminiscenční směsi (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, ThermoFisher) a LAS-4000 zobrazovacího systému.

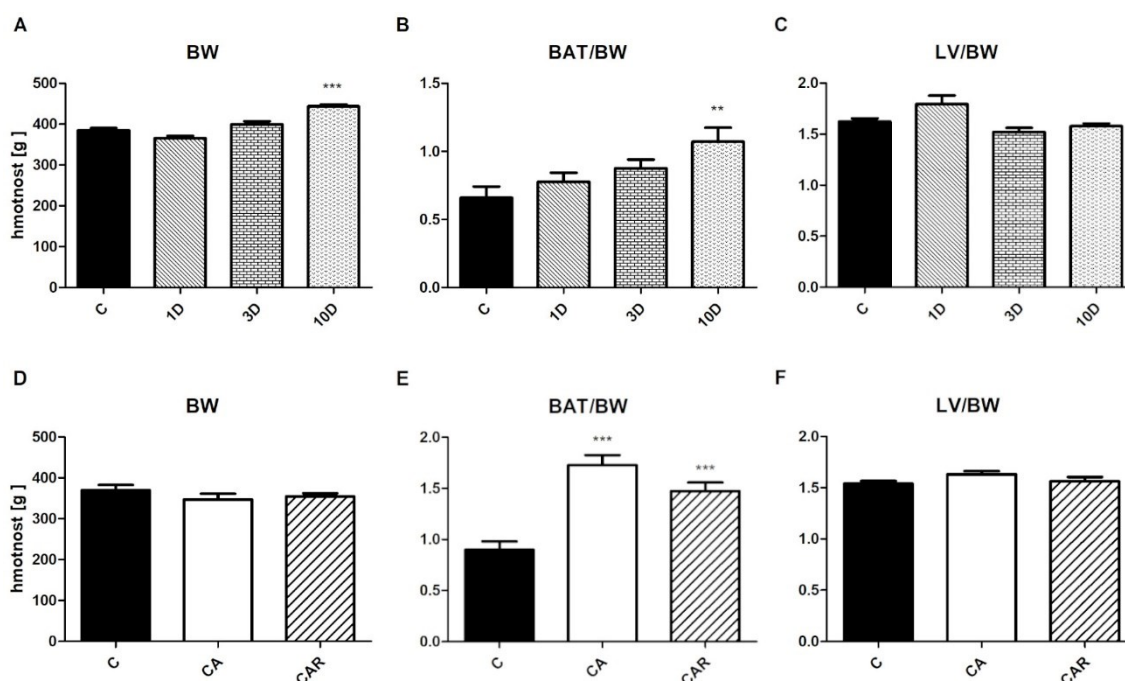
4.7. Statistická analýza

Relativní hladina proteinu byla následně kvantifikována s pomocí programu ImageJ Fiji win64 a byla vztažena na celkový protein detekovaný pomocí barvení Ponceau. Ke statistické analýze byl použit program GraphPad Prism 5, pro vyhodnocení byla použita metoda One way ANOVA a Dunnettův test (porovnání s kontrolou), $n = 6$ pro akutní aklimaci, $n = 8$ pro chronickou aklimaci, $*p < 0,05$.

5. Výsledky

5.1. Charakterizace hmotnostních parametrů potkanů v akutní a chronické chladové aklimaci a regresí

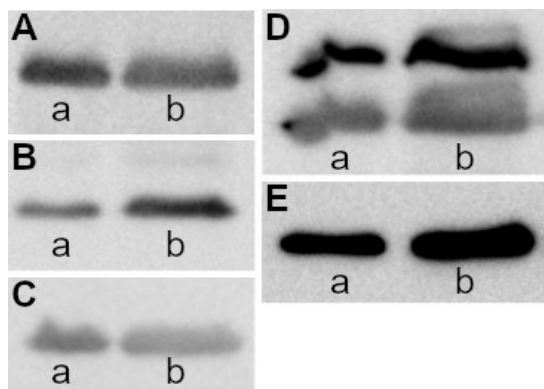
U všech zvířat byla zaznamenána tělesná hmotnost (Graf 1A, 1D), a po odběru orgánů také hmotnost BAT a hmotnost srdeční tkáně. Jak můžeme vidět (Graf 1B, 1E), poměr hmotnosti BAT k celkové tělesné hmotnosti během chladové aklimace postupně rostl a po 10 dnech aklimace došlo k jeho signifikantnímu zvýšení (62 %), které přetrvalo během aklimace po 5 týdnech (92 %) a následné regrese (64 %). Postupné zvyšování hmotnosti BAT svědčí o spuštění termogenní odpovědi. Poměr hmotnosti levé srdeční komory k celkové tělesné hmotnosti (Graf 1C, 1F) se naopak signifikantně neměnil.



Graf 1: Hmotnostní parametry. **A) + D)** Hmotnost potkanů (BW) [g] v den odběru tkání porovnaná mezi všemi skupinami. **B) + E)** Poměr mezi hmotností hnědé tukové tkáně (BAT) a hmotností potkanů (BW) porovnaná mezi všemi skupinami. **C) + F)** Poměr mezi hmotností levé srdeční komory (LV) a hmotností potkanů (BW) porovnaná mezi všemi skupinami. Kontrolní skupiny byly chovány při teplotě 24 ± 1 °C po celou dobu experimentu (C). Chladové skupiny byly vystaveny chladu 8 ± 1 °C po dobu 1 dne (1D), 3 dnů (3D), 10 dnů (10D), 5 týdnů (CA). Regresní skupina (CAR) byla po 5 týdnech v chladu 8 ± 1 °C navrátna na 2 týdny do teploty 24 ± 1 °C. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, * $p < 0,05$.

5.2. Charakterizace postnukleárního supernatantu

S použitím metod SDS-PAGE a Western blot byl charakterizován postnukleární supernatant, a byla potvrzena přítomnost markerů všech klíčových kompartmentů. Byl zjištěn pozitivní signál markeru cytosolu, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (Obr. 6A); peroxisomů, peroxisomální membránový protein 70 (Obr. 6B); plazmatické membrány, sodno-draselná pumpa (Obr. 6C); Ca²⁺ATPázy sarko/endoplazmatického retikula 2 (Obr. 6D) a mitochondrií, ATP-syntáza (Obr. 6E) ve dvou koncentracích.



Obr. 6: Charakterizace postnukleárního supernatantu pomocí proteinových markerů.

A) glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, B) peroxisomální membránový protein 70, C) sodno-draselná pumpa, D) Ca²⁺ATPáza sarko/endoplazmatického retikula 2, E) ATP-syntáza;

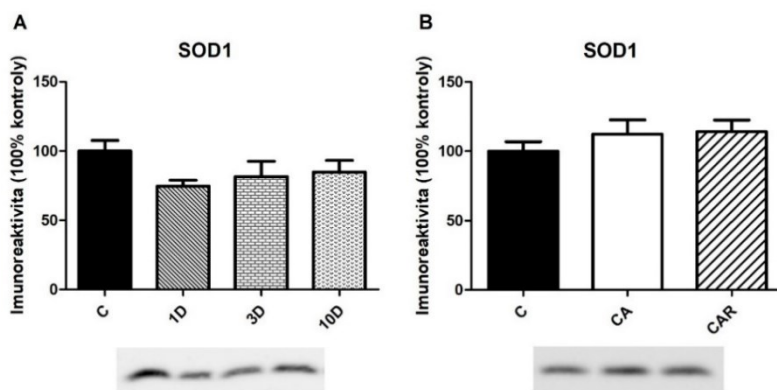
a) postnukleární supernatant v koncentraci 5 µg/jamka,

b) postnukleární supernatant v koncentraci 10 µg/jamka.

5.3. Antioxidanty odpovědné za degradaci ROS

5.3.1. Superoxiddismutáza 1

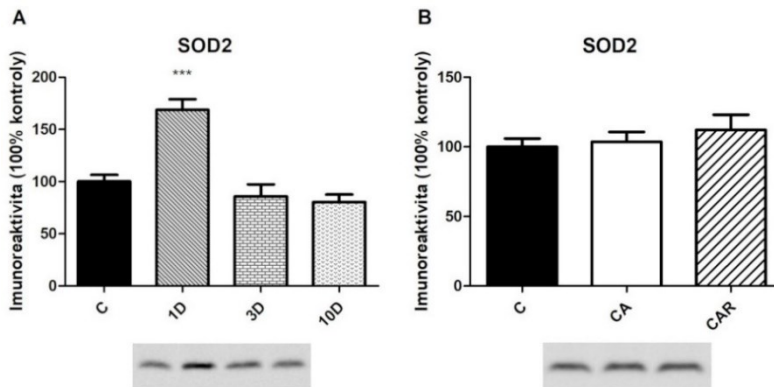
Stanovením relativní hladiny proteinu SOD1 vztažené na celkový protein detekovaný pomocí barvení Ponceau nebyla zjištěna signifikantní změna oproti kontrolní skupině ani v průběhu akutní chladové aklimace (Graf 2A), ani v průběhu chronické chladové aklimace a regrese (Graf 2B).



Graf 2: Relativní hladina proteinu superoxiddismutáza 1 (SOD1) v levé srdeční komoře vztažená na 100 % kontroly. Kontrolní skupiny byly chovány při teplotě 24 ± 1 °C po celou dobu experimentu (C). **A)** Chladové skupiny byly vystaveny chladu 8 ± 1 °C po dobu 1 dne (1D), 3 dnů (3D) a 10 dnů (10D). Hodnoty jsou uvedeny jako průměry ± SEM, n = 6, *p < 0,05. **B)** Chladová skupina (CA) byla vystavena chladu 8 ± 1 °C po dobu 5 týdnů, regresní skupina (CAR) byla po 5 týdnech v chladu 8 ± 1 °C navrácena na 2 týdny do teploty 24 ± 1 °C. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry ± SEM, n = 8, *p < 0,05.

5.3.2. Superoxiddismutáza 2

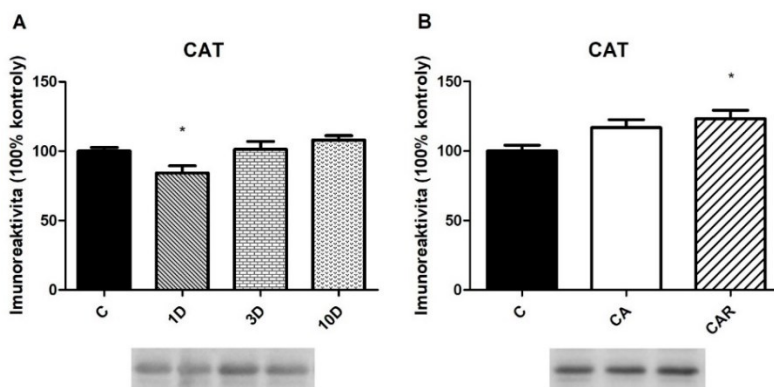
Stanovením relativní hladiny proteinu SOD2 vztažené na celkový protein detekovaný pomocí barvení Ponceau byl zjištěn signifikantní nárůst oproti kontrolní skupině v 1. dni akutní chladové aklimace o 69 % (Graf 3A), v průběhu chronické chladové aklimace a regrese nedocházelo k významným změnám (Graf 3B).



Graf 3.: Relativní hladina proteinu superoxiddismutáza 2 (SOD2) v levé srdeční komoře vztažená na 100 % kontroly. Kontrolní skupiny byly chovány při teplotě 24 ± 1 °C po celou dobu experimentu (C). **A)** Chladové skupiny byly vystaveny chladu 8 ± 1 °C po dobu 1 dne (1D), 3 dnů (3D) a 10 dnů (10D). Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 6$, $*p < 0,05$. **B)** Chladová skupina (CA) byla vystavena chladu 8 ± 1 °C po dobu 5 týdnů, regresní skupina (CAR) byla po 5 týdnech v chladu 8 ± 1 °C navrácena na 2 týdny do teploty 24 ± 1 °C. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 8$, $*p < 0,05$.

5.3.3. Kataláza

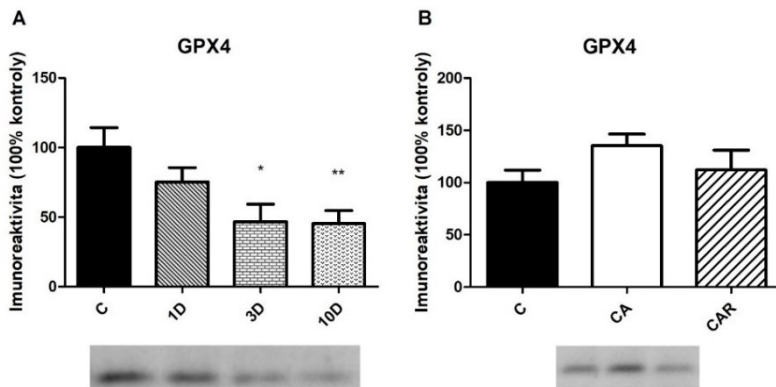
Stanovením relativní hladiny proteinu CAT vztažené na celkový protein detekovaný pomocí barvení Ponceau byl naměřen pokles v 1. dni chladové aklimace o 16 % (Graf 4A) a vzestup během regrese o 23 % (Graf 4B).



Graf 4: Relativní hladina proteinu kataláza (CAT) v levé srdeční komoře vztažená na 100 % kontroly. Kontrolní skupiny byly chovány při teplotě 24 ± 1 °C po celou dobu experimentu (C). **A)** Chladové skupiny byly vystaveny chladu 8 ± 1 °C po dobu 1 dne (1D), 3 dnů (3D) a 10 dnů (10D). Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 6$, $*p < 0,05$. **B)** Chladová skupina (CA) byla vystavena chladu 8 ± 1 °C po dobu 5 týdnů, regresní skupina (CAR) byla po 5 týdnech v chladu 8 ± 1 °C navrácena na 2 týdny do teploty 24 ± 1 °C. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 8$, $*p < 0,05$.

5.3.4. Glutathionperoxidáza 4

Stanovením relativní hladiny proteinu GPX4 vztažené na celkový protein detekovaný pomocí barvení Ponceau byl naměřen pokles ve 3 a v 10 dnech chladové aklimace o 53 % a 55 % v uvedeném pořadí (Graf 5A), během chronické chladové aklimace byla zaznamenána tendence ke zvýšení, která však nebyla signifikantní (Graf 5B).

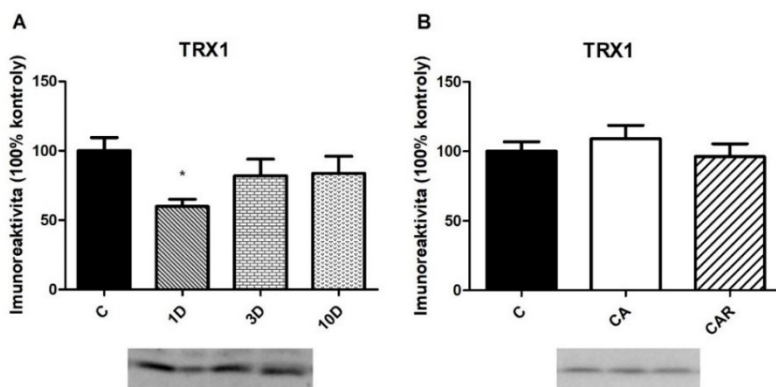


Graf 5: Relativní hladina proteinu glutathionperoxidáza 4 (GPX4) v levé srdeční komoře vztažená na 100 % kontrolu. Kontrolní skupiny byly chovány při teplotě $24 \pm 1^\circ\text{C}$ po celou dobu experimentu (C). **A)** Chladové skupiny byly vystaveny chladu $8 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 1 dne (1D), 3 dnů (3D) a 10 dnů (10D). Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 6$, $*p < 0,05$. **B)** Chladová skupina (CA) byla vystavena chladu $8 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 5 týdnů, regresní skupina (CAR) byla po 5 týdnech v chladu $8 \pm 1^\circ\text{C}$ navrátna na 2 týdny do teploty $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 8$, $*p < 0,05$.

5.4. Enzymy udržující v buňce redox homeostázu

5.4.1. Thioredoxin 1

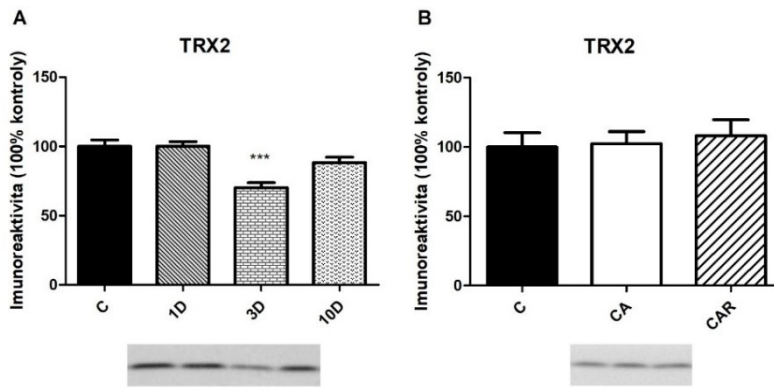
Stanovením relativní hladiny proteinu TRX1 vztažené na celkový protein detekovaný pomocí barvení Ponceau bylo naměřeno snížení v 1. dni chladové aklimace o 40 % (Graf 6A), v průběhu chronické chladové aklimace a regrese nedocházelo k významným změnám (Graf 6B).



Graf 6: Relativní hladina proteinu thioredoxin 1 (TRX1) v levé srdeční komoře vztažená na 100 % kontrolu. Kontrolní skupiny byly chovány při teplotě $24 \pm 1^\circ\text{C}$ po celou dobu experimentu (C). **A)** Chladové skupiny byly vystaveny chladu $8 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 1 dne (1D), 3 dnů (3D) a 10 dnů (10D). Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 6$, $*p < 0,05$. **B)** Chladová skupina (CA) byla vystavena chladu $8 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 5 týdnů, regresní skupina (CAR) byla po 5 týdnech v chladu $8 \pm 1^\circ\text{C}$ navrátna na 2 týdny do teploty $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 8$, $*p < 0,05$.

5.4.2. Thioredoxin 2

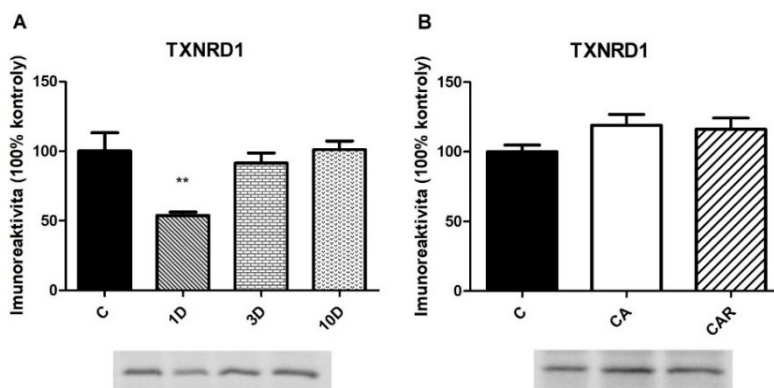
Stanovením relativní hladiny proteinu TRX2 vztažené na celkový protein detekovaný pomocí barvení Ponceau bylo naměřeno snížení ve 3. dni chladové aklimace o 30 % (Graf 7A), v průběhu chronické chladové aklimace a regrese nedocházelo k významným změnám (Graf 7B).



Graf 7: Relativní hladina proteinu thioredoxin 2 (TRX2) v levé srdeční komoře vztažená na 100 % kontroly. Kontrolní skupiny byly chovány při teplotě 24 ± 1 °C po celou dobu experimentu (C). **A)** Chladové skupiny byly vystaveny chladu 8 ± 1 °C po dobu 1 dne (1D), 3 dnů (3D) a 10 dnů (10D). Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 6$, $*p < 0,05$. **B)** Chladová skupina (CA) byla vystavena chladu 8 ± 1 °C po dobu 5 týdnů, regresní skupina (CAR) byla po 5 týdnech v chladu 8 ± 1 °C navrácena na 2 týdny do teploty 24 ± 1 °C. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 8$, $*p < 0,05$.

5.4.3. Thioredoxin reduktáza 1

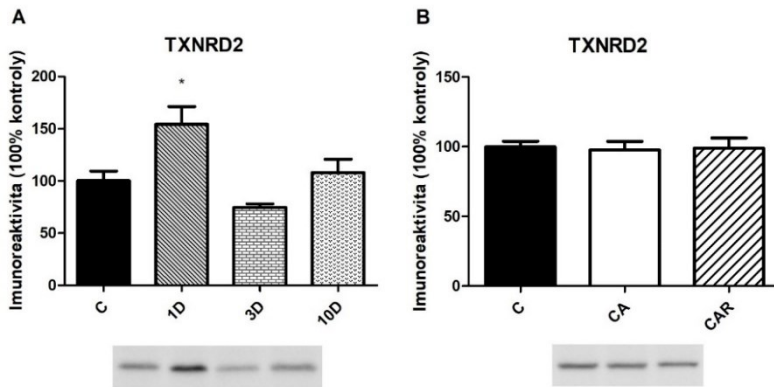
Stanovením relativní hladiny proteinu TXNRD1 vztažené na celkový protein detekovaný pomocí barvení Ponceau bylo naměřeno snížení v 1. dni chladové aklimace o 46 % (Graf 8A), v průběhu chronické chladové aklimace a regrese nedocházelo k významným změnám (Graf 8B).



Graf 8: Relativní hladina proteinu thioredoxinreduktáza 1 (TXNRD1) v levé srdeční komoře vztažená na 100 % kontroly. Kontrolní skupiny byly chovány při teplotě 24 ± 1 °C po celou dobu experimentu (C). **A)** Chladové skupiny byly vystaveny chladu 8 ± 1 °C po dobu 1 dne (1D), 3 dnů (3D) a 10 dnů (10D). Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 6$, $*p < 0,05$. **B)** Chladová skupina (CA) byla vystavena chladu 8 ± 1 °C po dobu 5 týdnů, regresní skupina (CAR) byla po 5 týdnech v chladu 8 ± 1 °C navrácena na 2 týdny do teploty 24 ± 1 °C. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 8$, $*p < 0,05$.

5.4.4. Thioredoxin reduktáza 2

Stanovením relativní hladiny proteinu TXNRD2 vztažené na celkový protein detekovaný pomocí barvení Ponceau bylo v 1. dni chladové aklimace naměřeno zvýšení o 54 % (Graf 9A), v průběhu chronické chladové aklimace a regrese nedocházelo ke změnám (Graf 9B).

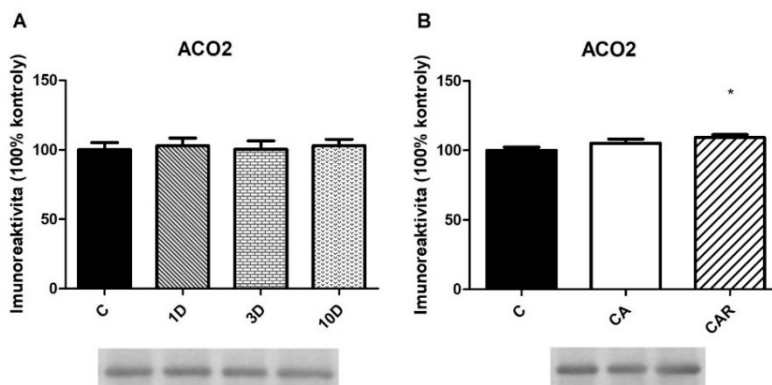


Graf 9: Relativní hladina proteinu thioredoxinreduktáza 2 (TXNRD2) v levé srdeční komoře vztažená na 100 % kontroly. Kontrolní skupiny byly chovány při teplotě 24 ± 1 °C po celou dobu experimentu (C). **A)** Chladové skupiny byly vystaveny chladu 8 ± 1 °C po dobu 1 dne (1D), 3 dnů (3D) a 10 dnů (10D). Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 6$, $*p < 0,05$. **B)** Chladová skupina (CA) byla vystavena chladu 8 ± 1 °C po dobu 5 týdnů, regresní skupina (CAR) byla po 5 týdnech v chladu 8 ± 1 °C navrácena na 2 týdny do teploty 24 ± 1 °C. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 8$, $*p < 0,05$.

5.5. Antioxidanty spojené s metabolismem železa

5.5.1. Akonitáza 2

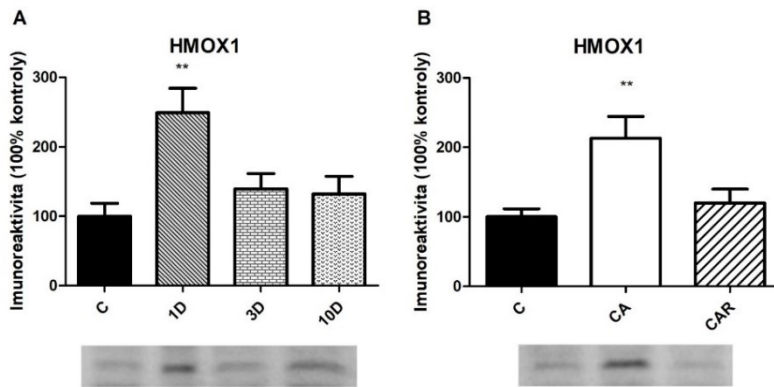
Stanovením relativní hladiny proteinu ACO2 vztažené na celkový protein detekovaný pomocí barvení Ponceau nebyly naměřeny během chladové aklimace žádné změny (Graf 10A), v průběhu regrese bylo zaznamenáno její mírné, ale signifikantní zvýšení o 9 % (Graf 10B).



Graf 10: Relativní hladina proteinu akonitáza 2 (ACO2) v levé srdeční komoře vztažená na 100 % kontroly. Kontrolní skupiny byly chovány při teplotě 24 ± 1 °C po celou dobu experimentu (C). **A)** Chladové skupiny byly vystaveny chladu 8 ± 1 °C po dobu 1 dne (1D), 3 dnů (3D) a 10 dnů (10D). Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 6$, $*p < 0,05$. **B)** Chladová skupina (CA) byla vystavena chladu 8 ± 1 °C po dobu 5 týdnů, regresní skupina (CAR) byla po 5 týdnech v chladu 8 ± 1 °C navrácena na 2 týdny do teploty 24 ± 1 °C. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 8$, $*p < 0,05$.

5.5.2. Hemoxygenáza 1

Stanovením relativní hladiny proteinu HMOX1 vztažené na celkový protein detekovaný pomocí barvení Ponceau bylo naměřeno signifikantní zvýšení exprese proteinu v 1. dni chladové aklimace o 149 % (Graf 11A) a v průběhu chronické chladové aklimace o 113 % (Graf 11B).



Graf 11: Relativní hladina proteinu hemoxygenáza 1 (HMOX1) v levé srdeční komoře vztažená na 100 % kontroly. Kontrolní skupiny byly chovány při teplotě 24 ± 1 °C po celou dobu experimentu (C). **A)** Chladové skupiny byly vystaveny chladu 8 ± 1 °C po dobu 1 dne (1D), 3 dnů (3D) a 10 dnů (10D). Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 6$, $*p < 0,05$. **B)** Chladová skupina (CA) byla vystavena chladu 8 ± 1 °C po dobu 5 týdnů, regresní skupina (CAR) byla po 5 týdnech v chladu 8 ± 1 °C navráćena na 2 týdny do teploty 24 ± 1 °C. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM, $n = 8$, $*p < 0,05$.

6. Diskuze

V předkládané diplomové práci jsem se zaměřila na účinky akutní chladové aklimace, chronické chladové aklimace a následné regrese na proteiny antioxidantního systému v srdci potkaních samců. Tím jsem se pokusila vyjasnit otázku, zda je kardioprotektivní efekt pozorovaný na předkládaných modelech spojen se změnou kapacity antioxidantního systému.

Nejprve jsme potvrdili, že u našich experimentálních zvířat nedocházelo ke změně poměru hmotnosti levé srdeční komory k hmotnosti těla a tím pádem k hypertrofii. Dále jsme díky zvyšování poměru hmotnosti BAT k hmotnosti těla mohli potvrdit, že docházelo k jejich chladové aklimaci. Tento poměr byl vyšší oproti kontrolním jedincům o 18 % v 1 dni, o 33 % ve 3 dnech, o 62 % v 10 dnech, o 92 % po 5-týdnech a o 64 % během regrese. Nárůst hmotnosti BAT během chladové aklimace se shoduje i s jinými pracemi (Wang et al. 2015; Tsibulnikov et al. 2019) a nedávnými výsledky naší laboratoře (Tibenska et al. 2020; 2021).

Jak bylo ukázáno v jiném experimentu, zvýšení tělesné teploty v průběhu I/R poškození zvyšuje rozsah srdeční nekrózy a snižuje průtok krve do ischemické oblasti během reperfúze. Zvýšení tělesné teploty, v průměru přibližně o 2 °C, mělo velmi neblahý vliv na stav králíčích samců s navozeným I/R poškozením. Takoví jedinci měli o 58 % větší infarkty a o 57 % nižší návrat krve do ischemické tkáně než normotermní subjekty (Hale et al. 2002). Na druhou stranu je známo, že hojně využívaná klinická hypotermie vede k vyšší odolnosti tkání k poškození (Askalan et al. 2011). Avšak náš model chladové aklimace nesnižuje teplotu, proto je potřeba hledat protektivní mechanismus jinde než v hypotermii. Chladová aklimace (8 ± 1 °C) potkaních samců měla v průběhu I/R poškození silné kardioprotektivní účinky (Tibenska et al. 2021, Marvanova, nepublikováno). Se stejnými chladovými modely použitými v těchto experimentech pracuji i já ve své diplomové práci.

Antioxidanty odpovědné za degradaci ROS, které jsem stanovila, tedy SOD1, SOD2, CAT, GPX4, vykazovaly následující změny exprese. V expresi prvního proteinu, tedy SOD1, nebyly zaznamenány žádné signifikantní změny. Během akutní aklimace mohla být pozorována spíše mírná tendence k poklesu, během chronické chladové aklimace zase k velmi mírnému stoupání. Značně signifikantní nárůst exprese proteinu SOD2 bylo možno sledovat v 1. dni chladové aklimace. Exprese proteinu CAT naopak v 1. dni poklesla, během chronické chladové aklimace se pak zvyšovala bez signifikance, regrese už však ukazovala její signifikantní vzestup. Dále byl během akutní aklimace pozorován neočekávaný postupný pokles exprese proteinu GPX4. Naopak 5-týdenní chronická aklimace vykazovala jistou nesignifikantní tendenci k nárůstu exprese, tato tendence nesetřvala během regrese.

Vzestup v expresi mitochondriální SOD2 byl tedy na počátku chladové aklimace doprovázen poklesem exprese CAT. Srdeční tkáň má obecně velmi nízkou aktivitu mitochondriální CAT a její mitochondrie tak produkují větší množství H_2O_2/g tkáně než většina ostatních orgánů. CAT potkaního srdce, která představuje 0,025 % mitochondriálních proteinů, může rozkládat H_2O_2 ještě dříve, než se přes mitochondriální membránu dostane do cytosolu (Radi et al. 1991). Pokles exprese CAT, který jsme pozorovali by tak mohl naznačovat akumulaci H_2O_2 také v mitochondriích.

Podobně byla sledována aktivita antioxidantů u hraboše mokřadního. Byly zde vytvořeny dvě skupiny, chladová skupina hrabošů, kteří se narodili a následně i žili v teplotě 8 ± 3 °C, a skupina stejně tak chovaná v teplotě 22 ± 3 °C. CAT zvýšila u chladové skupiny svou aktivitu v srdečním i kosterním svalu a v ledvinách. Na selenu závislá blíže nespecifikovaná GPX zvýšila svou aktivitu v srdečním svalu. Celková aktivita SOD se neměnila v kosterní svalovině ani v ledvinách, játrech nebo tenkém střevě, nesignifikantní zvýšení aktivity bylo pozorováno pouze v srdeční svalovině. Musíme ale upřesnit, že tito jedinci patřící do chladové skupiny prožili v této teplotě celý život ($61 \pm 1,9$ dní), nejednalo se také pouze o samce, jako v našem případě, zastoupení bylo naopak půl napůl samci a samice (Selman et al. 2000). Nutno podotknout, že hraboš mokřadní dává v přírodě zároveň přednost chladnějšímu klimatu a podmáčeným oblastem. V jiném experimentu vedlo 3-týdenní vystavení potkanů teplotě 7-8 °C v srdci ke zvýšení peroxidace lipidů, snížení aktivity CAT, celkové SOD i blíže nespecifikované GPX. SOD zde naproti předchozímu experimentu velmi signifikantně snižovala aktivitu i v ledvinách, játrech, tenkém střevě a mozku. Nutno také dodat, že zvířata byla chována v klecích samostatně a mohlo zde tedy docházet k sociálnímu stresu (Kaushik a Kaur 2003).

Dalšími zkoumanými proteiny byly proteiny thioredoxinového systému, které udržují v buňce důležitou homeostázu. Exprese proteinu TRX1 se v našich experimentech stejně jako exprese jeho reductázy TXNRD1 snížila v 1. dni chladové aklimace. Exprese mitochondriálního TRX2 poklesla ve 3. dni chladové aklimace, exprese jeho reductázy TXNRD2 naopak viditelně stoupla v 1. dni.

Tyto výsledky, které byly naměřeny u TRX2 a TXNRD2, by mohly podporovat již dříve zmíněné pozorované kompenzační změny u těchto dvou proteinů. Jednalo se o zvýšení hladiny TRX2 způsobené snížením hladiny TXNRD2 v srdci (Horstkotte et al. 2011) a dále pak o sníženou hladinu TRX2 doprovázenou silným zvýšením TXNRD2 u pacientů s dilatační kardiomyopatií (Huang et al. 2015). Zároveň je však možné pozorovat, že exprese TXNRD2 ve 3. dni měla taktéž tendenci ke klesání, avšak bez signifikance

Jak jsme již mnohokrát zmínili, thioredoxinový systém je pro srdce velice důležitý, a právě TXNRD2 je mimo jiného nezbytná pro správný srdeční vývoj (Conrad et al. 2004) a přinejmenším významná v ochraně srdce po ischemickém poškození (Horstkotte et al. 2011). Delece TRX2 zase vykazuje zvýšenou generaci a hromadění mitochondriálních ROS v myším srdci (Huang et al. 2015) nebo také v B lymfocytech kuřete (Tanaka et al. 2002). To se však neshoduje s neočekávanými výsledky jiného experimentu, podle kterých by měl TRX2 zvyšovat produkci ROS v mitochondriích. Buněčná overexprese TRX2 zde totiž zvyšovala hladinu mitochondriálních ROS v lidských embryonálních ledvinných buňkách. Naproti tomu overexprese TRX1 ji snižovala (Zhou et al. 2007).

V jiném experimentu byl využit zavedený model tzv. „mírného chronického intermitentního chladu“, což znamenalo, že potkaní samci byli po dobu 2 týdnů na 6 h/den vystavováni chladu 4 °C, následně byli vždy navraceni do stejné teploty jako kontrolní zvířata (teplota nebyla specifikována). Tito jedinci kromě snížené celkové tělesné hmotnosti, zvýšené hmotnosti BAT, nižší rektální teploty, která se ale v průběhu aklimace postupně zvyšovala, a vyšší hladiny ATP i ROS v srdci, kosterním svalu, BAT, játrech i mozku, vykazovali také zvýšenou expresi kryoprotektivního „chladem indukovatelného proteinu vázající RNA“ (CIRBP) a s tím spojenou expresi TRX1 ve všech těchto tkáních (Wang et al. 2015). Výrazné zvyšování hladiny ROS zde naznačovalo vznik oxidativního stresu. Ten však mohl být způsobený relativně nízkou teplotou, které byla zvířata vystavována. Pozorovaná přítomnost a zvýšená exprese TRX1 a CIRBP však nepochybně procesu chladové aklimace značně napomáhaly.

Pozorovali jsme také, že v předkládaných výsledcích docházelo k signifikantním změnám v expresi v průběhu chladové aklimace často u mitochondriálních proteinů (SOD2, TRX2, TXNRD2). Mohlo by to tedy znamenat, že během chladové aklimace dochází v srdeční tkáni k nějakým mitochondriálním změnám doprovázeným změnou exprese zde přítomných proteinů.

Podobná změna struktury mitochondrií v závislosti na vystavování chladným podmínkám byla již zaznamenána v jiných tkáních a orgánech, například v BAT. Mitochondriální kristy v BAT jsou obecně za normálních podmínek méně denzní, avšak již mírná chladová aklimace vyvolává u myši zvýšení denzity krist a změny stavby mitochondrií BAT (Bal et al. 2017).

Je také možné, že zvířata žijící ve větších nadmořských výškách, tedy i v chladnějších podmínkách, mají evolučně uzpůsobené svalové mitochondrie pro termogenezi. Experiment byl proveden s křečkem dlouhoocasým, který přirozeně obydluje vysoké nadmořské výšky,

a s křečkem bělonohým žijícím naopak spíše v nížinatých oblastech. Vysokonadmořští křečci dlouhočasí zvětšovali v chladu (5 °C) svá oxidativní, ne však glykolytická, svalová vlákna zadní končetiny. Měli také obecně vyšší respirační kapacitu v mitochondriích kosterní svaloviny než jejich příbuzní obydávající nízké nadmořské výšky. Chladová expozice (5 °C) tuto kapacitu nijak neměnila, naopak ji snižovalo vystavení hypoxii při teplotě 25 °C. Křeček bělonohý měl naproti tomu v pro něj příjemnější teplotě 25 °C a v normoxických podmínkách nízkou respirační kapacitu. Ta se začala viditelně zvyšovat navozením hypoxie, teplotou 5 °C, anebo navozením hypoxie a teploty 5 °C zároveň. Pozoruhodné je, že oba subjekty měly nejnižší relativní kapacitu komplexu II dýchacího řetězce v teplotě 5 °C, dále pak měly v této teplotě naměřenou vyšší „leak respiraci“ a nižší spřažení (*coupling*) oxidativní fosforylace (Mahalingam et al. 2020). Jiná zajímavá práce dokonce pojednává o změně morfologie mitochondrií kosterního svalstva během výstupu na Everest. Pozorováno bylo snížení mitochondriální hustoty v kosterním svalu, a to hlavně subsarkolemálních mitochondrií, snížení hladiny proteinů komplexu I a komplexu IV dýchacího řetězce a také UCP3 (Levett et al. 2012). Zde se ale pravděpodobně jednalo především o důsledek působení velmi vysoké nadmořské výšky a nízké hladiny kyslíku, než jen o důsledky nízké teploty.

S využitím tzv. terapeutické hypotermie je možné dosáhnout snížení poškození mozku během ischemických příhod. Jestli a jak se v takovém případě mění funkce nebo struktura mitochondrií bylo pozorováno v následujícím experimentu. Nižší (28 °C) než fyziologická (37 °C) teplota snižovala v permeabilizovaném myším mozku respirační tok elektronového transportního řetězce a taktéž jeho kapacitu, zaznamenám byl i pokles aktivity komplexů dýchacího řetězce, komplexu oxidativní fosforylace, ale také citrátsyntázy Krebsova cyklu. Zároveň bylo pozorováno, že k největšímu snížení aktivity došlo u komplexů II a V. Snížení aktivity komplexu II pak mohlo nejspíše umocnit využití komplexu I. Přesto, že byla aktivita ve všech komplexech takto snížena, zdála se být efektivnější a pozorováno bylo těsnější spřažení protonového gradientu s mitochondriální respirací. Pravděpodobně díky tomu docházelo ke snížení metabolické rychlosti a úspoře energie, k nižší tvorbě ROS a omezení smrti buněk (Pamenter et al. 2018). Terapeutická hypotermie by se mohla provádět i u pacientů po srdeční zástavě, ti by podle doporučení měli být ochlazováni na 32-34 °C po dobu 12-24 hodin (Nolan et al. 2003).

Zajímavostí je, že vědecká skupina zabývající se v Rakousku transplantační chirurgií usiluje o vyvinutí speciálního uchovávacího media, díky kterému by mohly být srdeční mitochondrie konzervovány na ledu bez ztráty nebo poškození jejich funkce. Takové medium

by obsahovalo antioxidanty, jakými jsou například vitamin E, glutathion nebo hovězí sérový albumin, dále pak mitochondriální substráty, ATP nebo histidin (Gnaiger et al. 2000).

Poslední skupinou proteinů zkoumaných v této diplomové práci byly antioxidanty spojené s metabolismem železa. Exprese proteinu ACO2 se v průběhu chladové aklimace neměnila, až regrese poukazovala na její mírný, ale signifikantní vzestup. Naproti tomu k viditelně signifikantním změnám v expresi docházelo u inducibilní HMOX1. Prudký nárůst jsme sledovali v 1 dni a také během 5-týdenní chronické chladové aklimace. Zvýšená exprese však již nebyla pozorována během regrese, zde naopak klesla spíše k hodnotám kontroly.

HMOX1 by mohla hrát ochrannou roli v prvopočátečním stresu u akutního modelu, kde chrání proti stresu endoplazmatického retikula. Jak bylo již dříve pozorováno, HMOX1 může být za určitých stresových podmínek nalezena ve vysokém množství v mitochondriích. Dalo by se tedy uvažovat o tom, jestli k takové akumulaci nedocházelo i u našeho chladového modelu. Tento jev byl zaznamenán například u makrofágů vystavených hypoxii (12h nebo 24h, 1% O₂) nebo chloridu kobaltnatému (Bansal et al. 2014), dále pak u plicních epitelálních buněk po jejich ošetření heminem nebo bakteriálním lipopolysacharidem. Nejvyšší mitochondriální akumulace HMOX1 byla však pozorována po ošetření živné půdy plicní buněčné kultury cigaretovým kouřem. Došlo zde také k mnohonásobnému zvýšení aktivity HMOX1. Overexprese HMOX1 zase chránila plicní epitelální buňky před poklesem ATP a před jejich nekrózou způsobenou cigaretovým kouřem (Slebos et al. 2007), taktéž snižovala oxidativní stres a omezovala myokardiální poškození během srdečního selhání (Collino et al. 2013).

Zvýšená exprese genu pro HMOX1 byla pozorována i v nečekaných případech. Terapeutické využití studené fyzikální plazmy, částečně ionizovaného plynu, který produkuje reaktivní formy kyslíku i dusíku, je zkoumáno pro své protinádorové účinky. Touto studenou plazmou bylo po dobu 4 hodin ošetřeno 8 lidských rakovinných buněčných kultur, všechny tyto kultury vykazovaly vysokou upregulaci genu pro HMOX1. Ve 2 kulturách byla pozorována taktéž upregulace PRDX1 a PRDX5, ale právě PRDX byly v některých kulturách naopak silně downregulovány (Bekeschus et al. 2018).

HMOX1 se též řadí mezi proteiny teplotního šoku, můžeme ji také nazývat proteinem teplotního šoku 32. Je však hodné pozornosti, že oproti známému proteinu teplotního šoku 70 nedocházelo během 90-minutového teplotního stresu (41 °C a 45 °C) k expresi genu pro HMOX1, a to ani v lidských mononukleárních buňkách periferní krve, ani v jaterních rakovinných buňkách použitých v experimentu (Bauer et al. 2003). Naproti tomu 30-minutová mírná testikulární hypertermie (40 °C a 42 °C) myši, která má za následek narušení spermatogeneze, smrt zárodečných buněk a rozvoj oxidativního stresu, zvyšovala signifikantně

expresi genu pro HMOX1. Ke zvýšené proteinové expresi však docházelo jen při teplotě 42 °C (Paul et al. 2009).

Co se týče ACO, tak v našem měření se exprese ACO2 během chladové aklimace neměnila. To by však mohlo souviset s tím že, jak bylo ukázáno, ACO2 bývá jako senzor oxidativního stresu reverzibilně inaktivována, ne však degradována (Gardner et al. 1995; Vásquez-Vivar et al. 2000; Bulteau et al. 2003). To tedy znamená, že nemusí docházet ke změnám v její hladině, aby mohlo docházet ke změně její aktivity (Bulteau et al. 2005). Bylo by tedy jistě zajímavou otázkou, zda by aklimace na chlad nemohla udržovat přítomnou ACO2 v aktivovaném stavu.

O tom, jak se chová ACO2 v závislosti na změnách teploty není mnoho známo. Změna aktivity ACO2 však byla pozorována u ektotermní ústřice viržinské žijící v teplotě mořské vody v rozmezí 20-30 °C, v závislosti na sezónních a denních výkyvech teplot. Při teplotě vody 30 °C byla její ACO2 shledána jako mnohem aktivnější než při teplotě 20 °C, která pro ni znamenala spíše teplotní stres (Cherkasov et al. 2007).

Nejen vysoká, ale i nízká teplota může u savců způsobovat oxidativní stres. To bylo ukázáno například během 20-minutového ochlazování zadní končetiny králíka pod anestezii z 28 °C na 0 °C. V končetině docházelo k rozvoji oxidativního stresu a omezení toku krve, ten se obnovoval po zahřátí. Právě v tu chvíli ale docházelo k největšímu poškození tkáně, podobně jako je tomu při reperfúzi. Antioxidanty, jakými jsou CAT nebo SOD, poškození tkáně snižovaly (Das et al. 1991).

Chladová aklimace je v mnoha původních pracích spojena s rozvojem hypertenze (Fregly et al. 1989) a následné levostranné srdeční hypertrofie (Cheng a Hauton 2008). V obou těchto experimentech však byla použita relativně nízká teplota. V prvním ze dvou uvedených experimentů byla použita teplota 4 °C. Během 4-týdenní aklimace byl zvířatům zároveň postupně měněn světelný režim z původního režimu 12:12 na 1:23, to tedy znamená pouze 1 hodinu světla a 23 hodin tmy. V tom druhém byla použita teplota 6 °C, zvířata však byla zase po dobu experimentu, tedy po dobu 4 týdnů, chována v klecích samostatně. To vše jistě přispívalo k jejich stresu. Proto také pro naše modely používáme námi již vyzkoušený mírný chlad 8 °C, který v podmínkách chovu s dostatečnou podestýlkou a v párech, kdy se zvířata vzájemně zahřívají, srdeční hypertrofii nezpůsobuje. Zvířata jsou chována po celou dobu při stálém světelném režimu 12:12 a chov v párech také eliminuje sociální stres, který by negativně ovlivňoval výsledky měření.

7. Závěr

V této práci jsme si položili otázku, zda antioxidantní systém hraje úlohu v kardioprotekci vyvolané chladem. Potkani použiti v tomto experimentu byli vystavováni mírnému chladu 8 ± 1 °C. Tento model, který byl již dříve vyvinutý v naší laboratoři, nezpůsobuje hypotermii ani srdeční hypertrofii, navozuje zvýšení BAT a má zjevné kardioprotektivní účinky. Z tohoto důvodu jsme studovali změny exprese antioxidantního systému, jehož enzymy, jak je známo, snižují oxidativní stres a hladinu ROS a zároveň také povětšinou působí protektivně na srdce zasažené ischemií.

Zjistili jsme aktivaci mitochondriální SOD2, zatímco CAT klesala na počátku chladové aklimace, což by mohlo vést k akumulaci H_2O_2 v mitochondriích. Tento stav byl kompenzován nárůstem mitochondriální TXNRD2. Exprese CAT vzrostla po návratu potkanů z chronické aklimace do tepla. Exprese dalšího mitochondriálního proteinu, ACO2, také stoupla až během opětovné regrese v 24 ± 1 °C, i přesto, že se během chladové aklimace její exprese neměnila. Lze tedy říci, že akutní chlad a zpětný návrat do tepla vyvolaly významné změny v expresi u mitochondriálních enzymů. Naproti tomu, SOD1 se neměnila a došlo k poklesu exprese cytosolického TRX1, TXNRD1, GPX4 i již zmíněné CAT v akutním chladu. Zajímavým nálezem je zvýšená exprese HMOX1 na počátku aklimace. HMOX1 hraje významnou roli v antioxidantních procesech endoplazmatického retikula i mitochondrií.

Tato práce přinesla nové poznatky o tom, jak se v levé srdeční komoře potkaních samců mění exprese některých proteinů antioxidantního systému v průběhu akutní, tedy 1-denní, 3-denní a 10-denní aklimace, během dlouhodobé chronické 5-týdenní aklimace a následné 2-týdenní regrese. Tyto poznatky jsou přínosné k objasnění kardioprotektivního účinku chladu na srdeční buňky a vyžadují další studium pomocí specifických inhibitorů na modelu infarktu in vivo, které na tuto práci navazují.

8. Seznam použité literatury

Sekundární zdroje označené *

*ABREU, Isabel A. a Diane E. CABELLI, 2010. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et biophysica acta*. **1804**(2), 263–274.

ALÁNOVÁ, Petra, Anna CHYTILOVÁ, Jan NECKÁŘ, Jaroslav HRDLIČKA, Petra MÍČOVÁ, Kristýna HOLZEROVÁ, Markéta HLAVÁČKOVÁ, Kristýna MACHÁČKOVÁ, František PAPOUŠEK, Jana VAŠINOVÁ, Daniel BENÁK, Olga NOVÁKOVÁ a František KOLÁŘ, 2017. Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. **122**(6), 1452–1461.

ANDRIA, Barbara, Adele BRACCO, Chiara ATTANASIO, Sigismondo CASTALDO, Maria Grazia CERRITO, Santolo COZZOLINO, Daniele DI NAPOLI, Roberto GIOVANNONI, Antonio MANCINI, Antonino MUSUMECI, Ernesto MEZZA, Mario NASTI, Vincenzo SCUDERI, Stefania STAIBANO, Marialuisa LAVITRANO, Leo E. OTTERBEIN a Fulvio CALISE, 2013. Biliverdin Protects against Liver Ischemia Reperfusion Injury in Swine. *PLoS ONE*. **8**(7), 1–8.

ASKALAN, Rand, Carol WANG, Hui SHI, Edward ARMSTRONG a Jerome Y. YAGER, 2011. The effect of postischemic hypothermia on apoptotic cell death in the neonatal rat brain. *Developmental neuroscience*. **33**(3–4), 320–329.

BAL, Naresh C., Sushant SINGH, Felipe C.G. REIS, Santosh K. MAURYA, Sunil PANI, Leslie A. ROWLAND a Muthu PERIASAMY, 2017. Both brown adipose tissue and skeletal muscle thermogenesis processes are activated during mild to severe cold adaptation in mice. *Journal of Biological Chemistry*. **292**(40), 16616–16625.

BANSAL, Seema, Gopa BISWAS a Narayan G. AVADHANI, 2014. Mitochondria-targeted heme oxygenase-1 induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in macrophages, kidney fibroblasts and in chronic alcohol hepatotoxicity. *Redox Biology*. **2**(1), 273–283.

BASUROY, Shyamali, Sujoy BHATTACHARYA, Dilyara TCHERANOVA, Yan QU, Raymond F. REGAN, Charles W. LEFFLER a Helena PARFENOVA, 2006. HO-2 provides endogenous protection against oxidative stress and apoptosis caused by TNF- α in cerebral vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. **291**(5), 897–908.

BAUER, Inge, Hauke RENSING, Annkathrein FLORAX, Christoph ULRICH, Georg PISTORIUS, Heinz REDL a Michael BAUER, 2003. Expression pattern and regulation of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 in human liver cells. *Shock (Augusta, Ga.)*. **20**(2), 116–122.

BEKESCHUS, Sander, Eric FREUND, Kristian WENDE, Rajesh Kumar GANDHIRAJAN a Anke SCHMIDT, 2018. Hmox1 Upregulation Is a Mutual Marker in Human Tumor Cells Exposed to Physical Plasma-Derived Oxidants. *Antioxidants*. **7**(11), 1–16.

BERNE, R. M., 1963. Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *The American journal of physiology*. **204**, 317–322.

BERTINATO, J, M ISKANDAR a MR L'ABBÉ, 2003. Copper deficiency induces the upregulation of the copper chaperone for Cu/Zn superoxide dismutase in weanling male rats. *The Journal of nutrition*. **133**(1), 28–31.

BHATIA, Maneet, Kelly L. MCGRATH, Giovanna DI TRAPANI, Pornpimol CHAROENTONG, Fenil SHAH, Mallory M. KING, Frank M. CLARKE a Kathryn F. TONISSEN, 2016. The thioredoxin system in breast cancer cell invasion and migration. *Redox Biology*. **8**, 68–78.

BINDOLI, Alberto, Lucia CAVALLINI, Maria Pia RIGOBELLO, Mariagrazia COASSIN a Fabio DI LISA, 1988. Modification of the xanthine-converting enzyme of perfused rat heart during ischemia and

oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. **4**(3), 163–167.

BLACKBURN, Patrick R., Matthew J. SCHULTZ, Carrie A. LAHNER, Dong LI, Elizabeth BHOJ, Laura J. FISHER, Deborah L. RENAUD, Amy KENNEY, Niema IBRAHIM, Mais HASHEM, Mohammed ZAIN SEIDAHMED, Linda HASADSRI, Samantha A. SCHRIER VERGANO, Fowzan S. ALKURAYA a Brendan C. LANPHER, 2020. Expanding the clinical and phenotypic heterogeneity associated with biallelic variants in ACO2. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. **7**(6), 1013–1028.

BLONDIN, Denis P., Amani DAOUD, Taryn TAYLOR, Hans C. TINGELSTAD, Véronique BÉZAIRE, Denis RICHARD, André C. CARPENTIER, Albert W. TAYLOR, Mary Ellen HARPER, Céline AGUER a François HAMAN, 2017. Four-week cold acclimation in adult humans shifts uncoupling thermogenesis from skeletal muscles to brown adipose tissue. *Journal of Physiology*. **595**(6), 2099–2113.

BRISTON, Thomas, Malcolm ROBERTS, Sian LEWIS, Ben POWNEY, James M. STADDON, Gyorgy SZABADKAI a Michael R. DUCHEN, 2017. Mitochondrial permeability transition pore: Sensitivity to opening and mechanistic dependence on substrate availability. *Scientific Reports*. **7**(1), 1–13.

BULTEAU, Anne Laure, Masao IKEDA-SAITO a Luke I. SZWEDA, 2003. Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry*. **42**(50), 14846–14855.

BULTEAU, Anne Laure, Kathleen C. LUNDBERG, Masao IKEDA-SAITO, Grazia ISAYA a Luke I. SZWEDA, 2005. Reversible redox-dependent modulation of mitochondrial aconitase and proteolytic activity during in vivo cardiac ischemia/reperfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**(17), 5987–5991.

CARTER, C. L. a L. R. AMUNDSEN, 1977. Infarct size and exercise capacity after myocardial infarction. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. **42**(5), 782–785.

CHA, Mee Kyung, Kyung Hoon SUH a Il Han KIM, 2009. Overexpression of peroxiredoxin i and thioredoxin1 in human breast carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. **28**(1), 1–12.

CHENG, Y. a D. HAUTON, 2008. Cold acclimation induces physiological cardiac hypertrophy and increases assimilation of triacylglycerol metabolism through lipoprotein lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1781**(10), 618–626.

CHERKASOV, Anton A., Robert A. OVERTON, Eugene P. SOKOLOV a Inna M. SOKOLOVA, 2007. Temperature-dependent effects of cadmium and purine nucleotides on mitochondrial aconitase from a marine ectotherm, *Crassostrea virginica*: A role of temperature in oxidative stress and allosteric enzyme regulation. *Journal of Experimental Biology*. **210**(1), 46–55.

CHOI, Min Hee, In Kyung LEE, Gyung Whan KIM, Bang Ul KIM, Ying Hao HAN, Dae Yeul YU, Hye Sun PARK, Kyung Yong KIM, Jong Seo LEE, Chulhee CHOI, Yun Soo BAE, Byung In LEE, Sue Goo RHEE a Sang Won KANG, 2005. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature*. **435**(7040), 347–353.

COHEN, Lyora A., Lucia GUTIERREZ, Avital WEISS, Yael LEICHTMANN-BARDOOGO, De Liang ZHANG, Daniel R. CROOKS, Rachid SOUGRAT, Avigail MORGENSTERN, Bruno GALY, Matthias W. HENTZE, Francisco J. LAZARO, Tracey A. ROUAULT a Esther G. MEYRON-HOLTZ, 2010. Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. *Blood*. **116**(9), 1574–1584.

COLLINO, Massimo, Alessandro PINI, Niccolò MUGELLI, Rosanna MASTROIANNI, Daniele BANI, Roberto FANTOZZI, Laura PAPUCCI, Marilena FAZI a Emanuela MASINI, 2013. Beneficial effect of prolonged heme oxygenase 1 activation in a rat model of chronic heart failure. *Disease Models*

& *Mechanisms*. **6**(4), 1012–1020.

CONRAD, Marcus, Cemile JAKUPOGLU, Stéphanie G. MORENO, Stefanie LIPPL, Ana BANJAC, Manuela SCHNEIDER, Heike BECK, Antonis K. HATZOPOULOS, Ursula JUST, Fred SINOWATZ, Wolfgang SCHMAHL, Kenneth R. CHIEN, Wolfgang WURST, Georg W. BORNKAMM a Markus BRIELMEIER, 2004. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Molecular and cellular biology*. **24**(21), 9414–9423.

CYPESS, Aaron M., Sanaz LEHMAN, Gethin WILLIAMS, Ilan TAL, Dean RODMAN, Allison B. GOLDFINE, Frank C. KUO, Edwin L. PALMER, Yu-Hua TSENG, Alessandro DORIA, Gerald M. KOLODNY a C. Ronald KAHN, 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine*. **360**(15), 1509–1517.

*D'ORIA, Rossella, Rossella SCHIPANI, Anna LEONARDINI, Annalisa NATALICCHIO, Sebastio PERRINI, Angelo CIGNARELLI, Luigi LAVIOLA a Francesco GIORGINO, 2020. The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2020**, 1–29.

DABKOWSKI, Erinne R., Courtney L. WILLIAMSON a John M. HOLLANDER, 2008. Mitochondria-specific transgenic overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) attenuates ischemia/reperfusion-associated cardiac dysfunction. *Free radical biology & medicine*. **45**(6), 855–865.

DAS, Dipak K., John C. RUSSELL a Randall M. JONES, 1991. Reduction of Cold Injury by Superoxide Dismutase and Catalase. *Free Radical Research Communications*. **13**(1), 653–662.

DAS, Kumuda C., Harish MUNIYAPPA, Venkatesh KUNDUMANI-SRIDHARAN a Jaganathan SUBRAMANI, 2021. Thioredoxin Decreases Anthracycline Cardiotoxicity, But Sensitizes Cancer Cell Apoptosis. *Cardiovascular toxicology*. **21**(2), 142–151.

DI LISA, Fabio, Roberta MENABÒ, Marcella CANTON, Maria BARILE a Paolo BERNARDI, 2001. Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Causes Depletion of Mitochondrial and Cytosolic NAD⁺ and Is a Causative Event in the Death of Myocytes in Postischemic Reperfusion of the Heart. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(4), 2571–2575.

ENGLAND, P. J., R. M. DENTON a P. J. RANDLE, 1967. The influence of magnesium ions and other bivalent metal ions on the aconitase equilibrium and its bearing on the binding of magnesium ions by citrate in rat heart. *Biochemical Journal*. **105**(2), 32C–33C.

FREGLY, M. J., D. C. KIKTA, R. M. THREATTE, J. L. TORRES a C. C. BARNEY, 1989. Development of hypertension in rats during chronic exposure to cold. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. **66**(2), 741–749.

FREITAS, Marta O., Tânia FRANCISCO, Tony A. RODRIGUES, Inês S. ALENCASTRE, Manuel P. PINTO, Cláudia P. GROU, Andreia F. CARVALHO, Marc FRANSEN, Clara SÁ-MIRANDA a Jorge E. AZEVEDO, 2011. PEX5 Protein Binds Monomeric Catalase Blocking Its Tetramerization and Releases It upon Binding the N-terminal Domain of PEX14. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**(47), 40509–40519.

GARDNER, P. R., I. RAINERI, L. B. EPSTEIN a C. W. WHITE, 1995. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*. **270**(22), 13399–13405.

GNAIGER, Erich, Andrej V. KUZNETSOV, Stefan SCHNEEBERGER, Rüdiger SEILER, Gerald BRANDACHER, Wolfgang STEURER a Raimund MARGREITER, 2000. Mitochondria in the Cold. *Life in the Cold*. 431–442.

GO, Young Mi, Thomas R. ZIEGLER, Jennifer M. JOHNSON, Li GU, Jason M. HANSEN a Dean P. JONES, 2007. Selective protection of nuclear thioredoxin-1 and glutathione redox systems against oxidation during glucose and glutamine deficiency in human colonic epithelial cells. *Free radical*

biology & medicine. **42**(3), 363–370.

GORDON, Kyle, Denis P. BLONDIN, Brian J. FRIESEN, Hans Christian TINGELSTAD, Glen P. KENNY a François HAMAN, 2019. Seven days of cold acclimation substantially reduces shivering intensity and increases nonshivering thermogenesis in adult humans. *Journal of Applied Physiology.* **126**(6), 1598–1606.

GOTTLIEB, Yehonatan, Marianna TRUMAN, Lyora A. COHEN, Yael LEICHTMANN-BARDOOGO a Esther G. MEYRON-HOLTZ, 2012. Endoplasmic reticulum anchored heme-oxygenase 1 faces the cytosol. *Haematologica.* **97**(10), 1489–1493.

GRANGER, D Neil, Gianfranco RUTILI a Joe M MCCORD, 1981. Superoxide Radicals in Feline Intestinal Ischemia. *GASTROENTEROLOGY.* **81**, 22–31.

GRIFFITHS, Elinor J a Andrew P HALESTRAPT, 1995. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* **307**, 93–98.

GU, Shuo, Hong HUA, Xinqi GUO, Zhanfeng JIA, Yi ZHANG, Leonid N. MASLOV, Xiangjian ZHANG a Huijie MA, 2018. PGC-1 α Participates in the Protective Effect of Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia on Cardiomyocytes. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology.* **50**(5), 1891–1902.

HADLEY, Kevin B. a Roger A. SUNDE, 2001. Selenium regulation of thioredoxin reductase activity and mRNA levels in rat liver. *The Journal of nutritional biochemistry.* **12**(12), 693–702.

HAILE, D. J., T. A. ROUAULT, J. B. HARFORD, M. C. KENNEDY, G. A. BLONDIN, H. BEINERT a R. D. KLAUSNER, 1992. Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high-affinity RNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **89**(24), 11735–11739.

HALE, Sharon L., Robert A. KLONER, B. E. SOBEL, A. MASERI a M. YACOUB, 2002. Elevated body temperature during myocardial ischemia/reperfusion exacerbates necrosis and worsens no-reflow. *Coronary artery disease.* **13**(3), 177–181.

HAMILTON, Karyn L., John C. QUINDRY, Joel P. FRENCH, Jess STAIB, Jeffrey HUGHES, Jawahar L. MEHTA a Scott K. POWERS, 2004. MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free Radical Biology and Medicine.* **37**(9), 1360–1368.

HANSEN, Jason M., Hong ZHANG a Dean P. JONES, 2006. Mitochondrial thioredoxin-2 has a key role in determining tumor necrosis factor- α -induced reactive oxygen species generation, NF- κ B activation, and apoptosis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology.* **91**(2), 643–650.

HARRAZ, Maged M., Jennifer J. MARDEN, Weihong ZHOU, Yulong ZHANG, Aislinn WILLIAMS, Victor S. SHAROV, Kathryn NELSON, Meihui LUO, Henry PAULSON, Christian SCHÖNEICH a John F. ENGELHARDT, 2008. SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *The Journal of Clinical Investigation.* **118**(2), 659–670.

HAUSENLOY, Derek J., Mihaela M. MOCANU a Derek M. YELLON, 2004a. Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: Its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovascular Research.* **63**(2), 305–312.

HAUSENLOY, Derek J, A TSANG, Mihaela M MOCANU a Derek M YELLON, 2005. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **288**, 971–976.

HAUSENLOY, Derek, Abigail WYNNE, Michael DUCHEN a Derek YELLON, 2004b. Transient Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening Mediates Preconditioning-Induced Protection. *Circulation.* **109**(14), 1714–1717.

- HIROSHIMA, Yuka, Takenori YAMAMOTO, Masahiro WATANABE, Yoshinobu BABA a Yasuo SHINOHARA, 2018. Effects of cold exposure on metabolites in brown adipose tissue of rats. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. **15**, 36–42.
- HIROTA, Kiichi, Minoru MATSUI, Satoshi IWATA, Akira NISHIYAMA, Kenjiro MORI a Junji YODOI, 1997. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**(8), 3633–3638.
- HO, YS, Y XIONG, W MA, A SPECTOR a DS HO, 2004. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *The Journal of biological chemistry*. **279**(31), 32804–32812.
- HORSTKOTTE, Jan, Tamara PERISIC, Manuela SCHNEIDER, Philipp LANGE, Melanie SCHROEDER, Claudia KIERMAYER, Rabea HINKEL, Tilman ZIEGLER, Pankaj K. MANDAL, Robert DAVID, Sabine SCHULZ, Sabine SCHMITT, Julian WIDDER, Fred SINOWATZ, Bernhard F. BECKER, Johann BAUERSACHS, Michael NAEBAUER, Wolfgang M. FRANZ, Irmela JEREMIAS, Markus BRIELMEIER, Hans ZISCHKA, Marcus CONRAD a Christian KUPATT, 2011. Mitochondrial thioredoxin reductase is essential for early postischemic myocardial protection. *Circulation*. **124**(25), 2892–2902.
- HUANG, Qunhua, Huanjiao Jenny ZHOU, Haifeng ZHANG, Yan HUANG, Ford HINOJOSA-KIRSCHENBAUM, Peidong FAN, Lina YAO, Luiz BELARDINELLI, George TELLIDES, Frank J. GIORDANO, Grant R. BUDAS a Wang MIN, 2015. Thioredoxin-2 inhibits mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis stress kinase-1 activity to maintain cardiac function. *Circulation*. **131**(12), 1082–1097.
- HUSAIN, K, E SUAREZ, A ISIDRO a L FERDER, 2010. Effects of paricalcitol and enalapril on atherosclerotic injury in mouse aortas. *American journal of nephrology*. **32**(4), 296–304.
- ICHIMURA, Takuya, Mika ITO, Kiyoshi TAKAHASHI, Kyohei OYAMA a Koichi SAKURAI, 2011. Involvement of mitochondrial swelling in cytochrome c release from mitochondria treated with calcium and Alloxan. *Journal of Biophysical Chemistry*. **2**(1), 10–18.
- IMAHASHI, Kenichi, Christian POTT, Joshua I. GOLDBERGER, Charles STEENBERGEN, Kenneth D. PHILIPSON a Elizabeth MURPHY, 2005. Cardiac-specific ablation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circulation Research*. **97**(9), 916–921.
- IMAI, Hirotaka, Daigo SUMI, Akiharu HANAMOTO, Masayoshi ARAI, Akinori SUGIYAMA, Nobuyoshi CHIBA, Yoshiyuki KUCHINO a Yasuhito NAKAGAWA, 1995. Molecular Cloning and Functional Expression of a cDNA for Rat Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase: 3'-Untranslated Region of the Gene Is Necessary for Functional Expression. *The Journal of Biochemistry*. **118**(5), 1061–1067.
- *INGWALL, Joanne S., 2009. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovascular Research*. **81**(3), 412–419.
- JAKUPOGLU, Cemile, Gerhard K. H. PRZEMECK, Manuela SCHNEIDER, Stéphanie G. MORENO, Nadja MAYR, Antonis K. HATZOPOULOS, Martin Hrabé DE ANGELIS, Wolfgang WURST, Georg W. BORNKAMM, Markus BRIELMEIER a Marcus CONRAD, 2005. Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Molecular and cellular biology*. **25**(5), 1980–1988.
- JANSKÝ, L, E MATOUŠKOVÁ, V VÁVRA, S VYBÍRAL, P JANSKÝ, D JANDOVÁ, I KNÍŽKOVÁ a P KUNC, 2006. Thermal, Cardiac and Adrenergic Responses to Repeated Local Cooling. *Physiol. Res*. **55**, 543–549.
- JANSKÝ, Ladislav, Stanislav VYBÍRAL, Miloslava TRUBAČOVÁ a Jan OKROUHLÍK, 2008. Modulation of adrenergic receptors and adrenergic functions in cold adapted humans. *European journal*

of applied physiology. **104**(2), 131–135.

JUDGE, S, YM JANG, A SMITH, T HAGEN a C LEEUWENBURGH, 2005. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **19**(3), 419–421.

KANG, Yan, Yong-Xing HE, Meng-Xi ZHAO a Wei-Fang LI, 2011. Structures of native and Fe-substituted SOD2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. **67**(10), 1173–1178.

KANG, YJ, X SUN, Y CHEN a Z ZHOU, 2002. Inhibition of doxorubicin chronic toxicity in catalase-overexpressing transgenic mouse hearts. *Chemical research in toxicology*. **15**(1), 1–6.

*KARLENIUS, Therese Christina a Kathryn Fay TONISSEN, 2010. Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in all States of Tumor Oxygenation. *Cancers 2010, Vol. 2, Pages 209-232*. **2**(2), 209–232.

KASPAROVA, Dita, Jan NECKAR, Ludmila DABROWSKA, Jiri NOVOTNY, Jaroslav MRAZ, Frantisek KOLAR a Jitka ZURMANOVA, 2015. Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems. *Physiological Genomics*. **47**(12), 612–620.

KATO, Masayoshi, Masaya MARUMO, Jun NAKAYAMA, Misaki MATSUMOTO, Chihiro YABENISHIMURA a Tohru KAMATA, 2016. The ROS-generating oxidase Nox1 is required for epithelial restitution following colitis. *Experimental Animals*. **65**(3), 197–205.

KAUSHIK, Susmita a Jyotdeep KAUR, 2003. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. **333**(1), 69–77.

KAVAZIS, Andreas N., Joseph M. MCCLUNG, David A. HOOD a Scott K. POWERS, 2008. Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. **294**(2), H928–H935.

KELLEY, Eric E., Nicholas K.H. KHOO, Nicholas J. HUNDLEY, Umair Z. MALIK, Bruce A. FREEMAN a Margaret M. TARPEY, 2010. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radical Biology and Medicine*. **48**(4), 493–498.

KENNEDY, M. C., L. MENDE-MUELLER, G. A. BLONDIN a H. BEINERT, 1992. Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef liver and its relationship to the iron-responsive element binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**(24), 11730–11734.

KIENHÖFER, Joachim, Dagmar Johanna Franziska HÄUSSLER, Florian RUCKELSHAUSEN, Elisabeth MUESSIG, Klaus WEBER, David PIMENTEL, Volker ULLRICH, Alexander BÜRKLE a Markus Michael BACHSCHMID, 2009. Association of mitochondrial antioxidant enzymes with mitochondrial DNA as integral nucleoid constituents. *The FASEB Journal*. **23**(7), 2034–2044.

KOLAR, David, Milada GRESIKOVA, Petra WASKOVA-ARNOSTOVA, Barbara ELSNICOVA, Jana KOHUTOVA, Daniela HORNIKOVA, Pavel VEBR, Jan NECKAR, Tereza BLAHOVA, Dita KASPAROVA, Jiri NOVOTNY, Frantisek KOLAR, Olga NOVAKOVA a Jitka M. ZURMANOVA, 2017. Adaptation to chronic continuous hypoxia potentiates Akt/HK2 anti-apoptotic pathway during brief myocardial ischemia/reperfusion insult. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **432**(1–2), 99–108.

*KOLÁŘ, F a B OŠŤÁDAL, 2004. Molecular Mechanisms of Cardiac Protection by Adaptation to Chronic Hypoxia. *Physiol. Res*. **53**, 3–13.

LEE, Youngil, Kisuk MIN, Erin E. TALBERT, Andreas N. KAVAZIS, Ashley J. SMUDER, Wayne T. WILLIS a Scott K. POWERS, 2012. Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia-

reperfusion injury. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. **44**(3), 397–405.

LEMASTERS, J. J., J. M. BOND, E. CHACON, I. S. HARPER, S. H. KAPLAN, H. OHATA, D. R. TROLLINGER, B. HERMAN a W. E. CASCIO, 1996. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS*. **76**, 99–114.

LETARTE, P. B., K. LIEBERMAN, K. NAGATANI, R. A. HAWORTH, G. B. ODELL a T. A. DUFF, 1993. Hemin: levels in experimental subarachnoid hematoma and effects on dissociated vascular smooth-muscle cells. *Journal of neurosurgery*. **79**(2), 252–255.

LEVETT, Denny Z, Elizabeth J RADFORD, David A MENASSA, E FRANZISKA GRABER, Andrea J MORASH, Hans HOPPELER, Kieran CLARKE, Daniel S MARTIN, Anne C FERGUSON-SMITH, Hugh E MONTGOMERY, Michael P W GROCOTT, Andrew J MURRAY a the CAUDWELL XTREME EVEREST RESEARCH GROUP, 2012. Acclimatization of skeletal muscle mitochondria to high-altitude hypoxia during an ascent of Everest. *The FASEB Journal*. **26**(4), 1431–1441.

LI, Guangqiu, Yan CHEN, Jack T. SAARI a Y. James KANG, 1997. Catalase-overexpressing transgenic mouse heart is resistant to ischemia-reperfusion injury. *The American journal of physiology*. **273**(3), H1090–H1095.

LI, Pengchong, Mengdi JIANG, Ketian LI, Hao LI, Yangzhong ZHOU, Xinyue XIAO, Yue XU, Suzanne KRISHFIELD, Peter E. LIPSKY, George C. TSOKOS a Xuan ZHANG, 2021. Glutathione peroxidase 4-regulated neutrophil ferroptosis induces systemic autoimmunity. *Nature immunology*. **22**(9), 1107–1117.

LI, Saisai, Xiaoli HU, Miaomiao YE a Xueqiong ZHU, 2018. The prognostic values of the peroxiredoxins family in ovarian cancer. *Bioscience reports*. **38**(5), 1–16.

LI, Xun, Kang TANG, Bin XIE, Shumin LI a George J. ROZANSKI, 2008. Regulation of Kv4 channel expression in failing rat heart by the thioredoxin system. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. **295**(1), H416–H424.

LI, Xuyi, Yan LIU, Huijie MA, Yue GUAN, Yue CAO, Yanming TIAN a Yi ZHANG, 2016. Enhancement of Glucose Metabolism via PGC-1 α Participates in the Cardioprotection of Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia. *Frontiers in physiology*. **7**(219), 1–8.

LINLEY, John E., Lezanne OOI, Louisa PETTINGER, Hannah KIRTON, John P. BOYLE, Chris PEERS a Nikita GAMPER, 2012. Reactive oxygen species are second messengers of neurokinin signaling in peripheral sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109**(24), E1578–E1586.

LIU, R, GR BUETTNER a LW OBERLEY, 2000. Oxygen free radicals mediate the induction of manganese superoxide dismutase gene expression by TNF- α . *Free radical biology & medicine*. **28**(8), 1197–1205.

LIU, Yingmei a Wang MIN, 2002. Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circulation research*. **90**(12), 1259–1266.

LUK, Edward, Mei YANG, Laran T. JENSEN, Yves BOURBONNAIS a Valeria Cizewski CULOTTA, 2005. Manganese Activation of Superoxide Dismutase 2 in the Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae**. *Journal of Biological Chemistry*. **280**(24), 22715–22720.

MAHALINGAM, Sajeni, Zachary A. CHEVIRON, Jay F. STORZ, Grant B. MCCLELLAND a Graham R. SCOTT, 2020. Chronic cold exposure induces mitochondrial plasticity in deer mice native to high altitudes. *The Journal of Physiology*. **598**(23), 5411–5426.

MELENOVSKY, Vojtech, Jiri PETRAK, Tomas MRACEK, Jan BENES, Barry A BORLAUG, Hana NUSKOVA, Tomas PLUHACEK, Jaroslav SPATENKA, Jana KOVALCIKOVA, Zdenek DRAHOTA, Josef KAUTZNER, Jan PIRK a Josef HOUSTEK, 2016. Myocardial iron content and

mitochondrial function in human heart failure: a direct tissue analysis. *European Journal of Heart Failure*. **19**(4), 522–530.

METODIEV, Metodi Dimitrov, Sylvie GERBER, Laurence HUBERT, Agnès DELAHODDE, Dominique CHRETIEN, Xavier GÉRARD, Patrizia AMATI-BONNEAU, Marie Christine GIACOMOTTO, Nathalie BODDAERT, Anna KAMINSKA, Isabelle DESGUERRE, Jeanne AMIEL, Marlène RIO, Josseline KAPLAN, Arnold MUNNICH, Agnès RÖTIG, Jean Michel ROZET a Claude BESMOND, 2014. Mutations in the tricarboxylic acid cycle enzyme, aconitase 2, cause either isolated or syndromic optic neuropathy with encephalopathy and cerebellar atrophy. *Journal of medical genetics*. **51**(12), 834–838.

MIYAWAKI, Hiroshi a Muhammad ASHRAF, 1997. Ca²⁺ as a mediator of ischemic preconditioning. *Circulation Research*. **80**(6), 790–799.

MURATA, Mitsushige, Masaharu AKAO, Brian O’ROURKE a Eduardo MARBÁN, 2001. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca²⁺ overload during simulated ischemia and reperfusion: Possible mechanism of cardioprotection. *Circulation Research*. **89**(10), 891–898.

MURPHY, E., M. PERLMAN, R. E. LONDON a C. STEENBERGEN, 1991. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circulation Research*. **68**(5), 1250–1258.

MURRY, C. E., R. B. JENNINGS a K. A. REIMER, 1986. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. **74**(5), 1124–1136.

NAPOLITANO, Silvia, Robin J. REBER, Marina RUBINI a Rudi GLOCKSHUBER, 2019. Functional analyses of ancestral thioredoxins provide insights into their evolutionary history. *The Journal of Biological Chemistry*. **294**(38), 14105–14118.

NEELY, JR a LW GROTYOHANN, 1984. Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circulation research*. **55**(6), 816–824.

NOLAN, J.P., P.T. MORLEY, T.L. Vanden HOEK, R.W. HICKEY, Members of the Advanced Life Support Task FORCE, W.G.J. KLOECK, J. BILLI, B.W. BÖTTIGER, P.T. MORLEY, J.P. NOLAN, K. OKADA, C. REYES, M. SHUSTER, P.A. STEEN, M.H. WEIL, V. WENZEL, Member of the Pediatric Life Support Task FORCE, R.W. HICKEY, Additional CONTRIBUTORS, P. CARLI, T.L. Vanden HOEK a D. ATKINS, 2003. Therapeutic Hypothermia After Cardiac Arrest. *Circulation*. **108**(1), 118–121.

NONN, Larisa, Ryan R. WILLIAMS, Robert P. ERICKSON a Garth POWIS, 2003. The Absence of Mitochondrial Thioredoxin 2 Causes Massive Apoptosis, Exencephaly, and Early Embryonic Lethality in Homozygous Mice. *Molecular and Cellular Biology*. **23**(3), 916–922.

NOWACK, Julia, Sebastian G. VETTER, Gabrielle STALDER, Johanna PAINER, Maria KRAL, Steve SMITH, Minh Hien LE, Perica JURCEVIC, Claudia BIEBER, Walter ARNOLD a Thomas RUF, 2019. Muscle nonshivering thermogenesis in a feral mammal. *Scientific Reports 2019 9:1*. **9**(1), 1–10.

OKA, Shin-Ichi, Adave CHIN, Ji Yeon PARK, Shohei IKEDA, Wataru MIZUSHIMA, Guersom RALDA, Peiyong ZHAI, Mingming TONG, Jaemin BYUN, Fan TANG, Yudai EINAGA, Chun-Yang HUANG, Toshihide KASHIHARA, Mengyuan ZHAO, Jihoon NAH, Bin TIAN, Yoko HIRABAYASHI, Junji YODOI a Junichi SADOSHIMA, 2020. Thioredoxin-1 maintains mitochondrial function via mechanistic target of rapamycin signalling in the heart. *Cardiovascular Research*. **116**(10), 1742–1755.

ORAVA, Janne, Pirjo NUUTILA, Tommi NOPONEN, Riitta PARKKOLA, Tapio VILJANEN, Sven ENERBÄCK, Aila RISSANEN, Kirsi H. PIETILÄINEN a Kirsi A. VIRTANEN, 2013. Blunted metabolic responses to cold and insulin stimulation in brown adipose tissue of obese humans. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. **21**(11), 2279–2287.

- PAMENTER, Matthew E., Gigi Y. LAU a Jeffrey G. RICHARDS, 2018. Effects of cold on murine brain mitochondrial function. *PLOS ONE*. **13**(12), 1–12.
- PARK, Byung Joon, Mee Kyung CHA a Il Han KIM, 2014. Thioredoxin 1 as a serum marker for breast cancer and its use in combination with CEA or CA15-3 for improving the sensitivity of breast cancer diagnoses. *BMC research notes*. **7**(1), 1–12.
- PARK, Tae Jun, Jei Hyoung PARK, Ga Seul LEE, Ji Yoon LEE, Ji Hye SHIN, Min Wook KIM, Yong Sook KIM, Jeong Yoon KIM, Kyoung Jin OH, Baek Soo HAN, Won Kon KIM, Youngkeun AHN, Jeong Hee MOON, Jaewhan SONG, Kwang Hee BAE, Do Han KIM, Eun Woo LEE a Sang Chul LEE, 2019. Quantitative proteomic analyses reveal that GPX4 downregulation during myocardial infarction contributes to ferroptosis in cardiomyocytes. *Cell Death & Disease*. **10**(11), 1–15.
- PARKS, D. A., A. K. SHAH a D. N. GRANGER, 1984. Oxygen radicals: Effects on intestinal vascular permeability. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. **10**(2), 167–170.
- PAUL, Catriona, Serena TENG a Philippa T.K. SAUNDERS, 2009. A Single, Mild, Transient Scrotal Heat Stress Causes Hypoxia and Oxidative Stress in Mouse Testes, Which Induces Germ Cell Death. *Biology of Reproduction*. **80**(5), 913–919.
- PENDERGRASS, Karl D., Susan T. VARGHESE, Kathryn MAIELLARO-RAFFERTY, Milton E. BROWN, W. Robert TAYLOR a Michael E. DAVIS, 2011. Temporal effects of catalase overexpression on healing after myocardial infarction. *Circulation: Heart Failure*. **4**(1), 98–106.
- PÉREZ-VÁZQUEZ, V, J RAMÍREZ, L AGUILERA-AGUIRRE, JC GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, M CLEMENTE-GUERRERO, S MANZO-AVALOS, S URIBE a A SAAVEDRA-MOLINA, 2002. Effect of Ca(2+) and Mg(2+) on the Mn-superoxide dismutase from rat liver and heart mitochondria. *Amino acids*. **22**(4), 405–416.
- PERRY, J. Jefferson P., Amy S. HEARN, Diane E. CABELLI, Harry S. NICK, John A. TAINER a David N. SILVERMAN, 2009. Contribution of Human Manganese Superoxide Dismutase Tyrosine 34 to Structure and Catalysis†. *Biochemistry*. **48**(15), 3417–3424.
- PITULA, Joseph S., Kathryn M. DECK, Stephen L. CLARKE, Sheila A. ANDERSON, Aparna VASANTHAKUMAR a Richard S. EISENSTEIN, 2004. Selective inhibition of the citrate-to-isocitrate reaction of cytosolic aconitase by phosphomimetic mutation of serine-711. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**(30), 10907–10912.
- POTTER, Soshanna Zittin, Haining ZHU, Bryan Francis SHAW, Jorge A RODRIGUEZ, Peter A DOUCETTE, Se Hui SOHN, Armando DURAZO, Kym F FAULL, Edith Butler GRALLA, Aram M NERSISSIAN a Joan Selverstone VALENTINE, 2007. Binding of a single zinc ion to one subunit of copper-zinc superoxide dismutase apoprotein substantially influences the structure and stability of the entire homodimeric protein. *J. Am. Chem. Soc.* **129**(15), 4575–4583.
- QIAO, Xin, Jinjin XU, Qing Jun YANG, Yun DU, Shaoqing LEI, Zhi Hong LIU, Xinwei LIU a Huimin LIU, 2013. Transient acidosis during early reperfusion attenuates myocardium ischemia reperfusion injury VIA PI3K-AKT-enos signaling pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- QUINDRY, John, Joel FRENCH, Karyn HAMILTON, Youngil LEE, Jawahar L. MEHTA a Scott POWERS, 2005. Exercise training provides cardioprotection against ischemia-reperfusion induced apoptosis in young and old animals. *Experimental Gerontology*. **40**(5), 416–425.
- RADI, R., J. F. TURRENS, L. Y. CHANG, K. M. BUSH, J. D. CRAPO a B. A. FREEMAN, 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. **266**(32), 22028–22034.
- REGAN, Raymond F., Jing CHEN a Luna BENVENISTI-ZAROM, 2004. Heme oxygenase-2 gene deletion attenuates oxidative stress in neurons exposed to extracellular hemin. *BMC Neuroscience*. **5**(1).
- REHRING, Thomas F., Joseph I. SHAPIRO, Brian S. CAIN, Daniel R. MELDRUM, Joseph G. CLEVELAND, Alden H. HARKEN a Anirban BANERJEE, 1998. Mechanisms of pH preservation

- during global ischemia in preconditioned rat heart: Roles for PKC and NHE. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. **275**(3), 805–813.
- REIMER, K. A., C. E. MURRY, I. YAMASAWA, M. L. HILL a R. B. JENNINGS, 1986. Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. **251**(6), H1306–H1315.
- REZVANI, HR, F MAZURIER, M CARIO-ANDRÉ, C PAIN, C GED, A TAÏEB a H DE VERNEUIL, 2006. Protective effects of catalase overexpression on UVB-induced apoptosis in normal human keratinocytes. *The Journal of biological chemistry*. **281**(26), 17999–18007.
- SAFO, MK, FN MUSAYEV, SH WU, DJ ABRAHAM a TP KO, 2001. Structure of tetragonal crystals of human erythrocyte catalase. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. **57**(1), 1–7.
- SANTIAGO, Ana Paula S.A., Elen Aguiar CHAVES, Marcus F. OLIVEIRA a Antonio GALINA, 2008. Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie*. **90**(10), 1566–1577.
- SATTLER, W, M MAIORINO a R STOCKER, 1994. Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and Ebselen (PZ 51). *Archives of biochemistry and biophysics*. **309**(2), 214–221.
- SAWICKI, KonradTeodor, Meng SHANG, Rongxue WU, Hsiang Chun CHANG, Arineh KHECHADURI, Tatsuya SATO, Christine KAMIDE, Ting LIU, Sathyamangla V. NAGA PRASAD a Hossein ARDEHALI, 2015. Increased Heme Levels in the Heart Lead to Exacerbated Ischemic Injury. *Journal of the American Heart Association*. **4**(8), 1–16.
- SCHEERER, P, A BORCHERT, N KRAUSS, H WESSNER, C GERTH, W HÖHNE a H KUHN, 2007. Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry*. **46**(31), 9041–9049.
- SCHRADER, Jürgen a Eckehart GERLACH, 1976. Compartmentation of cardiac adenine nucleotides and formation of adenosine. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. **367**(2), 129–135.
- SCHRÖDER, Ewald, Jonathan P. BRENNAN a Philip EATON, 2008. Cardiac peroxiredoxins undergo complex modifications during cardiac oxidant stress. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. **295**(1), H425–H433.
- SEIDLMAYER, Lea K., Vanessa V. JUETTNER, Sarah KETTLEWELL, Evgeny V. PAVLOV, Lothar A. BLATTER a Elena N. DEDKOVA, 2015. Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia-reperfusion: Contributions of Ca²⁺, ROS, pH, and inorganic polyphosphate. *Cardiovascular Research*. **106**(2), 237–248.
- SELMAN, Colin, Jane S. MCLAREN, Marjaana J. HIMANKA a John R. SPEAKMAN, 2000. Effect of long-term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal. *Free radical biology & medicine*. **28**(8), 1279–1285.
- SHARMA, Sudha, Susmita BHATTARAI, Hosne ARA, Grace SUN, Daret K. ST CLAIR, Md Shenuarin BHUIYAN, Christopher KEVIL, Megan N. WATTS, Paari DOMINIC, Takahiko SHIMIZU, Kevin J. MCCARTHY, Hong SUN, Manikandan PANCHATCHARAM a Sumitra MIRIYALA, 2020. SOD2 deficiency in cardiomyocytes defines defective mitochondrial bioenergetics as a cause of lethal dilated cardiomyopathy. *Redox Biology*. **37**, 1–14.
- SHEERAN, Freya L a Salvatore PEPE, 2016. Posttranslational modifications and dysfunction of mitochondrial enzymes in human heart failure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **311**, 449–460.
- ŠIMEČKOVÁ, M., L. JANSKÝ, I. LESNÁ, S. VYBÍRAL a P. ŠRÁMEK, 2000. Role of beta adrenoceptors in metabolic and cardiovascular responses of cold exposed humans. *Journal of thermal biology*. **25**(6), 437–442.

- SINGH, Raphael M., Emanuel CUMMINGS, Constantinos PANTOS a Jaipaul SINGH, 2017. Protein kinase C and cardiac dysfunction: a review. *Heart Failure Reviews*. **22**(6), 843–859.
- SLEBOS, Dirk Jan, Stefan W. RYTER, Marco VAN DER TOORN, Fang LIU, Fengli GUO, Catherine J. BATY, Jenny M. KARLSSON, Simon C. WATKINS, Hong Pyo KIM, Xue WANG, Janet S. LEE, Dirkje S. POSTMA, Henk F. KAUFFMAN a Augustine M.K. CHOI, 2007. Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. **36**(4), 409–417.
- *SNEZHKINA, Anastasiya V., Anna V. KUDRYAVTSEVA, Olga L. KARDYMON, Maria V. SAVVATEEVA, Nataliya V. MELNIKOVA, George S. KRASNOV a Alexey A. DMITRIEV, 2019. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2019**, 1–17.
- SÖRENSSON, Peder, Nawzad SALEH, Frederic BOUVIER, Felix BÖHM, Magnus SETTERGREN, Kenneth CAIDAHL, Per TORNVALL, Håkan ARHEDEN, Lars RYDÉN a John PERNOW, 2010. Effect of postconditioning on infarct size in patients with ST elevation myocardial infarction. *Heart*. **96**(21), 1710–1715.
- ŠRÁMEK, P., M. ŠIMEČKOVÁ, L. JANSKÝ, J. ŠAVLÍKOVÁ a S. VYBÍRAL, 2000. Human physiological responses to immersion into water of different temperatures. *European journal of applied physiology*. **81**(5), 436–442.
- STRASSBURGER, M, W BLOCH, S SULYOK, J SCHÜLLER, AF KEIST, A SCHMIDT, Wenk J, Peters T, Wlaschek M, Lenart J, Krieg T, Hafner M, Kümin A, Werner S, Müller W a Scharffetter-Kochanek K, 2005. Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase results in severe lipid peroxidation and spontaneous apoptosis in murine myocardium in vivo. *Free radical biology & medicine*. **38**(11), 1458–1470.
- STROEV, Serguei A., Tatjana S. GLUSCHENKO, Ekaterina I. TJULKOVA, Giannis SPYROU, Elena A. RYBNIKOVA, Michail O. SAMOILOV a Markku PELTO-HUIKKO, 2004. Preconditioning enhances the expression of mitochondrial antioxidant thioredoxin-2 in the forebrain of rats exposed to severe hypobaric hypoxia. *Journal of neuroscience research*. **78**(4), 563–569.
- SUWEI, Wang, Stephen S LEONARD, Vince CASTRANOVA, Val VALLYATHAN a Xianglin SHI, 1999. The role of superoxide radical in TN F- α induced N F- κ B activation*. **29**(3), 192–199.
- TAKASHI, En, Yigang WANG a Muhammad ASHRAF, 1999. Activation of mitochondrial K(ATP) channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway. *Circulation Research*. **85**(12), 1146–1153.
- TANAKA, Masashi, Golnaz K. MOKHTARI, Raya D. TERRY, Leora B. BALSAM, Keun Ho LEE, Theo KOFIDIS, Philip S. TSAO a Robert C. ROBBINS, 2004. Overexpression of Human Copper/Zinc Superoxide Dismutase (SOD1) Suppresses Ischemia–Reperfusion Injury and Subsequent Development of Graft Coronary Artery Disease in Murine Cardiac Grafts. *Circulation*. **110**(11), 200–206.
- TANAKA, Toru, Fumihito HOSOI, Yuko YAMAGUCHI-IWAI, Hajime NAKAMURA, Hiroshi MASUTANI, Shugo UEDA, Akira NISHIYAMA, Shunichi TAKEDA, Hiromi WADA, Giannis SPYROU a Junji YODOI, 2002. Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *The EMBO journal*. **21**(7), 1695–1703.
- TANI, M a J R NEELY, 1989. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circulation Research*. **65**(4), 1045–1056.
- TERNETTE, Nicola, Ming YANG, Mahima LAROYIA, Mitsuhiro KITAGAWA, Linda O'FLAHERTY, Kathryn WOLHULTER, Kaori IGARASHI, Kaori SAITO, Keiko KATO, Roman FISCHER, Alexandre BERQUAND, Benedikt M. KESSLER, Terry LAPPIN, Norma FRIZZELL, Tomoyoshi SOGA, Julie ADAM a Patrick J. POLLARD, 2013. Inhibition of Mitochondrial Aconitase

by Succination in Fumarate Hydratase Deficiency. *Cell Reports*. **3**(3), 689–700.

THOMPSON-GORMAN, S. L. a J. L. ZWEIER, 1990. Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *Journal of Biological Chemistry*. **265**(12), 6656–6663.

TIAN, Wen Fang, Ping WENG, Qiong SHENG, Jun Liang CHEN, Peng ZHANG, Ji Ru ZHANG, Bin DU, Min Chen WU, Qing Feng PANG a Jian Jun CHU, 2017. Biliverdin Protects the Isolated Rat Lungs from Ischemia-reperfusion Injury via Antioxidative, Anti-inflammatory and Anti-apoptotic Effects. *Chinese Medical Journal*. **130**(7), 859–865.

TIBENSKA, V., A. BENESOVA, P. VEBR, A. LIPTAKOVA, L. HEJNOVÁ, B. ELSNICOVÁ, Z. DRAHOTA, D. HORNIKOVA, F. GALATÍK, D. KOLAR, S. VYBIRAL, P. ALÁNOVÁ, J. NOVOTNÝ, F. KOLAR, O. NOVAKOVA a J. M. ZURMANOVA, 2020. Gradual cold acclimation induces cardioprotection without affecting β -adrenergic receptor-mediated adenylyl cyclase signaling. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. **128**(4), 1023–1032.

TIBENSKA, Veronika, Aneta MARVANOVÁ, Barbara ELSNICOVA, Lucie HEJNOVA, Pavel VEBR, Jiri NOVOTNÝ, Frantisek KOLAR, Olga NOVAKOVA a Jitka M. ZURMANOVA, 2021. The cardioprotective effect persisting during recovery from cold acclimation is mediated by the β_2 -adrenoceptor pathway and Akt activation. *Journal of Applied Physiology*. **130**(3), 746–755.

TSIBULNIKOV, Sergey Y., Leonid N. MASLOV, Natalia V. NARYZHNAYA, Huijie MA, Yury B. LISHMANOV, Peter R. OELTGEN a Keith GARLID, 2018. Role of protein kinase C, PI3 kinase, tyrosine kinases, NO-synthase, KATP channels and MPT pore in the signaling pathway of the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia. *General physiology and biophysics*. **37**(5), 537–547.

TSIBULNIKOV, Sergey Y., Leonid N. MASLOV, Natalya V. NARYZHNAYA, Vladimir V. IVANOV, Yury V. BUSHOV, Nikita S. VORONKOV, Amteshwar S. JAGGI, Yi ZHANG a Peter R. OELTGEN, 2019. Impact of cold adaptation on cardiac tolerance to ischemia/reperfusion. Role of glucocorticoid and thyroid hormones. *General Physiology and Biophysics*. **38**(3), 245–251.

UENO, Masaya, Hiroshi MASUTANI, Roberto Jun ARAI, Akira YAMAUCHI, Kiichi HIROTA, Toshiyuki SAKAI, Takashi INAMOTO, Yoshio YAMAOKA, Junji YODOI a Toshio NIKAIDO, 1999. Thioredoxin-dependent Redox Regulation of p53-mediated p21 Activation. *Journal of Biological Chemistry*. **274**(50), 35809–35815.

UJCIKOVA, Hana, Adam ECKHARDT, Dmytro KAGAN, Lenka ROUBALOVA a Petr SVOBODA, 2014. Proteomic analysis of post-nuclear supernatant fraction and percoll-purified membranes prepared from brain cortex of rats exposed to increasing doses of morphine. *Proteome Science*. **12**(1), 1–14.

VAN DER LANS, Anouk A.J.J., Joris HOEKS, Boudewijn BRANS, Guy H.E.J. VIJGEN, Mariëlle G.W. VISSER, Maarten J. VOSSelman, Jan HANSEN, Johanna A. JÖRGENSEN, Jun WU, Felix M. MOTTAGHY, Patrick SCHRAUWEN a Wouter D. VAN MARKEN LICHTENBELT, 2013. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. **123**(8), 3395–3403.

VÁSQUEZ-VIVAR, Jeannette, B. KALYANARAMAN a Mary Claire KENNEDY, 2000. Mitochondrial Aconitase Is a Source of Hydroxyl Radical: AN ELECTRON SPIN RESONANCE INVESTIGATION. *Journal of Biological Chemistry*. **275**(19), 14064–14069.

VENARDOS, Kylie, Kevin ASHTON, John HEADRICK a Anthony PERKINS, 2005. Effects of dietary selenium on post-ischemic expression of antioxidant mRNA. *Molecular and cellular biochemistry*. **270**(1–2), 131–138.

VYBÍRAL, S., I. LESNÁ, L. JANSKÝ a V. ZEMAN, 2000. Thermoregulation in winter swimmers and physiological significance of human catecholamine thermogenesis. *Experimental Physiology*. **85**(3), 321–326.

WALTON, Paul A., Chantal BREES, Celien LISMONT, Oksana APANASETS a Marc FRANSEN,

2017. The peroxisomal import receptor PEX5 functions as a stress sensor, retaining catalase in the cytosol in times of oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. **1864**(10), 1833–1843.
- WANG, Xiao Mei, Hong Pyo KIM, Kiichi NAKAHIRA, Stefan W. RYTER a Augustine M. K. CHOI, 2009. The heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway suppresses TLR4 signaling by regulating the interaction of TLR4 with caveolin-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. **182**(6), 3809–3818.
- WANG, Xiaohui, Honglei CHE, Wenbin ZHANG, Jiye WANG, Tao KE, Rui CAO, Shanshan MENG, Dan LI, Ouyang WEIMING, Jingyuan CHEN a Wenjing LUO, 2015. Effects of Mild Chronic Intermittent Cold Exposure on Rat Organs. *International journal of biological sciences*. **11**(10), 1171–1180.
- WASKOVA-ARNOSTOVA, Petra, Barbara ELSNICOVA, Dita KASPAROVA, Daniela HORNIKOVA, Frantisek KOLAR, Jiri NOVOTNY a Jitka ZURMANOVA, 2015. Cardioprotective adaptation of rats to intermittent hypobaric hypoxia is accompanied by the increased association of hexokinase with mitochondria. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. **119**(12), 1487–1493.
- WASKOVA-ARNOSTOVA, Petra, Dita KASPAROVA, Barbara ELSNICOVA, Jiri NOVOTNY, Jan NECKAR, Frantisek KOLAR a Jitka ZURMANOVA, 2014. Chronic Hypoxia Enhances Expression and Activity of Mitochondrial Creatine Kinase and Hexokinase in the Rat Ventricular Myocardium. *Cellular Physiology and Biochemistry*. **33**(2), 310–320.
- WEGLARZ-TOMCZAK, Ewelina, Jakub M. TOMCZAK, Michał TALMA, Małgorzata BURDA-GRABOWSKA, Mirosław GIURG a Stanley BRUL, 2021. Identification of ebselen and its analogues as potent covalent inhibitors of papain-like protease from SARS-CoV-2. *Scientific Reports 2021 11:1*. **11**(1), 1–10.
- WEICHSEL, Andrzej, John R. GASDASKA, Garth POWIS a William R. MONTFORT, 1996. Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure*. **4**(6), 735–751.
- WELSH, Sarah J., William T. BELLAMY, Briehl Margaret M. a Powis GARTH, 2002. The Redox Protein Thioredoxin-1 (Trx-1) Increases Hypoxia-inducible Factor 1 α Protein Expression | Cancer Research | American Association for Cancer Research. *Cancer Research*. **62**(17), 5089–5095.
- WEST, EC a JR PROHASKA, 2004. Cu,Zn-superoxide dismutase is lower and copper chaperone CCS is higher in erythrocytes of copper-deficient rats and mice. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*. **229**(8), 756–764.
- WHITE, Christopher, Emma AMBROSE, Alison M€ ULLER, Sanaz HATAMI, Yun LI, Hoa LE, James THLIVERIS, Rakesh ARORA, Trevor LEE, Ian DIXON, Ganghong TIAN, Jayan NAGENDRAN, Larry HRYSHKO a Darren FREED, 2017. Impact of Reperfusion Calcium and pH on the Resuscitation of Hearts Donated After Circulatory Death. *The Annals of Thoracic Surgery*. **103**, 122–130.
- WONG, GH, JH ELWELL, LW OBERLEY a DV GOEDDEL, 1989. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell*. **58**(5), 923–931.
- YAMAGUCHI, Takenori, Keiji SANO, Kintomo TAKAKURA, Isamu SAITO, Yukito SHINOHARA, Takao ASANO a Hajime YASUHARA, 1998. Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. *Stroke*. **29**(1), 12–17.
- YAMASHITA, Nobushige, Shiro HOSHIDA, Kinya OTSU, Michio ASAHI, Tsunehiko KUZUYA a Masatsugu HORI, 1999. Exercise Provides Direct Biphasic Cardioprotection via Manganese Superoxide Dismutase Activation. *The Journal of Experimental Medicine*. **189**(11), 1699–1706.
- YANG, Xiulin, An CHEN, Qingchun LIANG, Qianqian DONG, Mingwei FU, Xiaoyu LIU, Siyi

- WANG, Yining LI, Yuanzhi YE, Zirong LAN, Jing Song OU, Lihe LU a Jianyun YAN, 2021. Up-regulation of heme oxygenase-1 by celastrol alleviates oxidative stress and vascular calcification in chronic kidney disease. *Free Radical Biology and Medicine*. **172**, 530–540.
- YAO, Hongwei, Abigail L. PETERSON, Jie LI, Haiyan XU a Phyllis A. DENNERY, 2020. Heme Oxygenase 1 and 2 Differentially Regulate Glucose Metabolism and Adipose Tissue Mitochondrial Respiration: Implications for Metabolic Dysregulation. *International Journal of Molecular Sciences*. **21**(19), 1–14.
- YAO, Yin, Zhian CHEN, Hao ZHANG, Cailing CHEN, Ming ZENG, Joseph YUNIS, Yunbo WEI, Yanmin WAN, Naiqi WANG, Mingzhe ZHOU, Chao QIU, Qunxiong ZENG, Hong Sheng ONG, Hao WANG, Fadzai Victor MAKOTA, Yang YANG, Zhaohui YANG, Nan WANG, Jun DENG, Chao SHEN, Yan XIA, Lin YUAN, Zhaoqin LIAN, Yike DENG, Cuilian GUO, Ao HUANG, Pengcheng ZHOU, Haibo SHI, Weitian ZHANG, Hongliang YI, Dongmei LI, Ming XIA, Jing FU, Ning WU, Judy B. DE HAAN, Nan SHEN, Wenhong ZHANG, Zheng LIU a Di YU, 2021. Selenium-GPX4 axis protects follicular helper T cells from ferroptosis. *Nature immunology*. **22**(9), 1127–1139.
- YARIAN, Connie S., Dikran TOROSER a Rajindar S. SOHAL, 2006. Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice. *Mechanisms of Ageing and Development*. **127**(1), 79–84.
- YI, Xianwen, Longquan XU, Kuikwon KIM, Hyung-Suk KIM a Nobuyo MAEDA, 2010. Genetic reduction of lipoic acid synthase expression modestly increases atherosclerosis in male, but not in female, apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*. **211**(2), 424–430.
- YONG-SONG, CHEN, ZHU XU-XIN, ZHAO XIAO-YUN, XING HAN-YING a LI YU-GUANG, 2008. Hemin, a heme oxygenase-1 inducer, improves aortic endotheli...: Chinese Medical Journal. *Chinese Medical Journal*. **121**(3), 241–247.
- YOSHIDA, Tetsuya, Nilanjana MAULIK, Ye Shih HO, Jawed ALAM a Dipak K. DAS, 2001. Hmox-1 constitutes an adaptive response to effect antioxidant cardioprotection: A study with transgenic mice heterozygous for targeted disruption of the heme oxygenase-1 gene. *Circulation*. **103**(12), 1695–1701.
- YU, Y., E. RADISKY a E. A. LEIBOLD, 1992. The iron-responsive element binding protein. Purification, cloning, and regulation in rat liver. *Journal of Biological Chemistry*. **267**(26), 19005–19010.
- ZENG, Lingling, Yang YANG, Yujuan HU, Yu SUN, Zhengde DU, Zhen XIE, Tao ZHOU a Weijia KONG, 2014. Age-Related Decrease in the Mitochondrial Sirtuin Deacetylase Sirt3 Expression Associated with ROS Accumulation in the Auditory Cortex of the Mimetic Aging Rat Model. *PLoS ONE*. **9**(2), 1–11.
- ZHANG, Guoming, Song GAO, Xiaoyan LI, Lulu ZHANG, Hong TAN, Lin XU, Yaoyu CHEN, Yongjian GENG, Yanliang LIN, Benjamin AERTKER a Yuanyuan SUN, 2015. Pharmacological Postconditioning with Lactic Acid and Hydrogen Rich Saline Alleviates Myocardial Reperfusion Injury in Rats. *Scientific Reports*. **5**(1), 1–8.
- ZHANG, Hong, Young Mi GO a Dean P. JONES, 2007. Mitochondrial thioredoxin-2/peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress. *Archives of biochemistry and biophysics*. **465**(1), 119–126.
- ZHANG, Rong, Rafia AL-LAMKI, Lanfang BAI, Jeffrey W. STREB, Joseph M. MIANO, John BRADLEY a Wang MIN, 2004. Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner. *Circulation research*. **94**(11), 1483–1491.
- ZHAO, C. M., X. J. YANG, J. H. YANGA, X. J. CHENG, X. ZHAO, B. Y. ZHOU, S. D. XU a H. F. WANG, 2012. Effect of ischaemic postconditioning on recovery of left ventricular contractile function after acute myocardial infarction. *Journal of International Medical Research*. **40**(3), 1082–1088.
- ZHENG, L., M. C. KENNEDY, H. BEINERT a H. ZALKIN, 1992. Mutational analysis of active site

residues in pig heart aconitase. *Journal of Biological Chemistry*. **267**(11), 7895–7903.

ZHOU, Jie, Anastassios E. DAMDIMOPOULOS, Giannis SPYROU a Bernhard BRÜNE, 2007. Thioredoxin 1 and thioredoxin 2 have opposed regulatory functions on hypoxia-inducible factor-1 α . *Journal of Biological Chemistry*. **282**(10), 7482–7490.

ZHU, Xiaofeng, Shuichuan HUANG, Lili ZENG, Jieyi MA, Suhong SUN, Feng ZENG, Fanli KONG a Xiaoming CHENG, 2017. HMOX-1 inhibits TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in the MCF-7 breast cancer cell line. *International Journal of Molecular Medicine*. **40**(2), 411–417.

Internetové zdroje:

WHO, 2021 Cardiovascular diseases (CVDs). *World Health Organization* [online]. Dostupné z: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

9. Přílohy

9.1. Příloha 1

TME pufr:

TME	10 ml
Trizma base	24,2 mg
MgCl ₂	6,1 mg
EDTA	2,92 mg
cOMplete inhibitory	200 µl
PhosSTOP inhibitory	1 tableta

TMES pufr, (pH 7,4):

- přidat do TME 0,86 g sacharózy

Laemmliho vzorkový pufr, 4x koncentrovaný:

Vzorkový pufr	10 ml
TRIS pufr pH 6,9	4,8 ml
Glycerol	1 ml
SDS	0,8 g
DTT	0,8 g
bromfenolová modř	1 mg

Dělicí a zaostřovací gel (množství na 4 gely):

	Dělicí gel 12%	Zaostřovací gel 5%
H ₂ O (ml)	5,8	5,2
AA sol. A (ml)	8	1,7
Tris 8,9 sol. C (ml)	5	0
Tris 6,9 sol. D (ml)	0	2,5
SDS sol. B (ml)	0,2	0,1
APS sol. G (ml)	1	0,5

AA sol. A: (30% akrylamidový roztok (Sigma))

Tris pH 8,9 sol. C:

Tris C	100 ml
Trizma base	18,2 g
TEMED	345 µl

Tris pH 6,9 sol. D:

Tris D	50 ml
Trizma base	3,025 g
TEMED	345 µl

SDS sol. B:

SDS B	10 ml
SDS	1 g

APS sol. G:

APS G	5 ml
APS	90 mg

Elektrodový pufr pro elektroforézu:

Elektrodový pufr, koncentrovaný	1 l
Trisma base	30,3 g
Glycin	144,0 g
SDS	10,0 g

- pro SDS elektroforézu 10x naředěno

Towbin pufr:

Towbin	1 l
Trisma base	3,03 g
Glycin	14,4 g
methanol	200 ml

TBS (4 °C, pH 7,5):

TBS	5 l
Trisma base	12,1 g
NaCl	146,2 g

TTBS (4°C)

- přidat do 1 l TBS 0,5 ml Tween 20

Ponceau S:

Ponceau S	250 ml
Ponceau	250 mg
99% kyselina octová	12,5 ml

9.2. Příloha 2

Použité primární a sekundární protilátky:

Primární protilátka	Ředění	Sekundární protilátka	Ředění
Total OXPHOS Blue Native WB Antibody Cocktail ab110412	1:250	Goat anti-mouse sc2380	1:10000
GAPDH mAb #5174	1:1000	Goat anti-rabbit A0546	1:10000
Anti-PMP70 SAB4200181	1:1000	Goat anti-mouse sc2380	1:10000
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase α sc-28800	1:2000	Goat anti-rabbit A0546	1:10000
SERCA2 2A7-A1	1:1000	Goat anti-mouse sc2380	1:10000
SOD1 sc-11407	1:1000	Goat anti-rabbit A0546	1:10000
SOD2 sc-30080	1:1000	Goat anti-rabbit A0546	1:10000
CAT sc-50508	1:1000	Goat anti-rabbit A0546	1:10000
GPX4 ab125066	1:5000	Goat anti-rabbit A0546	1:10000
TRX1 ab86255	1:1000	Goat anti-rabbit A0546	1:10000
TRX2 ab185544	1:1000	Goat anti-rabbit A0546	1:10000
TXNRD1 ab124954	1:5000	Goat anti-rabbit A0546	1:10000
TXNRD2 ab180493	1:1000	Goat anti-rabbit A0546	1:10000
ACO2 ab129105	1:20000	Goat anti-rabbit A0546	1:10000
HMOX1 ab13243	1:2000	Goat anti-rabbit A0546	1,5:10000